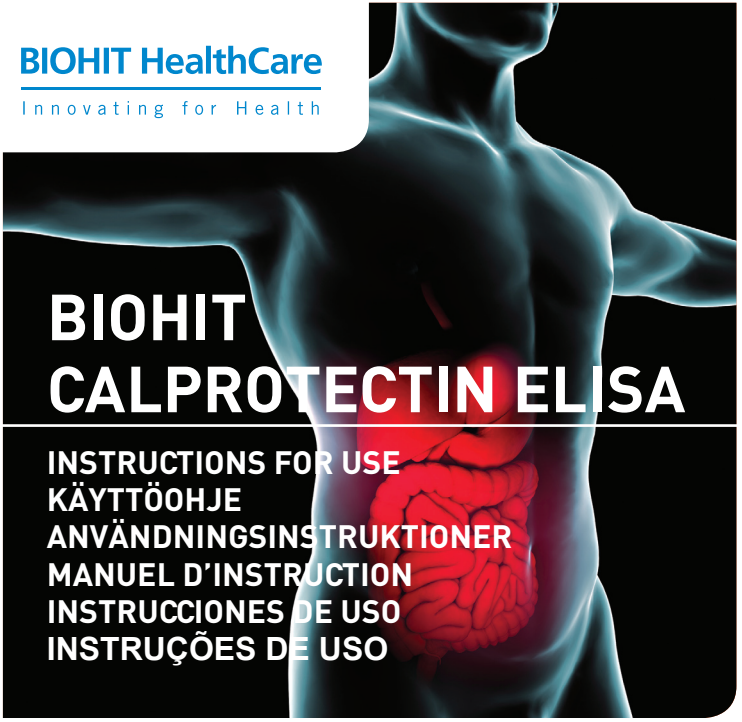
BIOHIT HealthCare

Innovating for Health



BIOHIT CALPROTECTIN ELISA

INSTRUCTIONS FOR USE
KÄYTTÖOHJE
ANVÄNDNINGSINSTRUKTIONER
MANUEL D'INSTRUCTION
INSTRUCCIONES DE USO
INSTRUÇÕES DE USO

REF 602 260 IVD CE

For *in vitro* diagnostic use

Store at 2-8 °C Upon Receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland
Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi, www.biohithealthcare.com

SYMBOLS/SYMBOLIT/SYMBOLER/SYMBOLES/SÍMBOLOS/SIMBOLOS/

	English	Suomi	Svenska	
IVD	For *in vitro* diagnostic use	*In vitro* diagnostiseen käyttöön	*För in vitro -diagnostiskt bruk*	
LOT	Batch code	Eränumero	Batchkod	
	Use by	Erääntymis-päivämäärä	Används före	
+2 °C +8 °C	Storage limitation Store at +2…+8°C	Lämpötilarajoitteet Säilytys +2…+8 °C	Förvaringsbegrän-sning Förvaras vid 2 – 8 °C	
CE	CE Mark	CE-merkki	CE-märke	
REF	Catalogue Number	Kataloginumero	Katalognummer	
Σ 96	96 determinations	96 määritystä	96 bestämningar	
2	Do not re-use	Älä käytä uudelleen	Får ej återanvändas	
i	Consult instructions for use	Lue käyttöohjeet	Se bruksanvisningen	
WASH 20x	Washing Buffer Con-centrate (20x)	Pesupuskuri konsen-traatti (20x)	Tvättbuffertkoncentrat (20x)	
DILBUF 5x	Sample Diluent Buffer Concentrate (5x)	Laimennospuskuri konsentraatti (5x)	Provspädningsbuffert-koncentrat (5x)	
FEC EXTRBUF 2.5X	Fecal Extraction Buffer (2.5x)	Ulostenäytepuskuri konsentraatti (2.5x)	Fekalextraktionsbuffert (2.5x)	
BLANK	Blank	0-näyteliuos	Blank	
CAL 1-5	Calibrators 1-5	Kalibraattorit 1-5	Kalibratorer 1-5	
CONTROL LOW	Low Control	Matala kontrolli	Låg kontroll	
CONTROL HIGH	High Control	Korkea kontrolli	Hög kontroll	
CONJ	Conjugate	Konjugaattiliuos	Konjugat	
SUBS	Substrate	Substraattiliuos	Substrat	

	Français	Español	Português
	Utilisation réservée au diagnostic *in vitro*	Para uso diagnóstico *in vitro*	Para utilização no diagnóstico *in vitro*
	Lot	Código de lote	Código de lote
	Utiliser avant	Fecha de caducidad	Não utilizar depois de
	Conserver à une température comprise entre +2 et +8°C	Limitación de almacenamiento Almacenar a 2-8 °C	Limites de armazenamento Armazenar a +2…+8 °C
	Marquage CE	Marca CE	Marca CE
	Numéro de référence	Número de catálogo	Número de catálogo
	96 déterminations	96 determinaciones	96 determinações
	Ne pas réutiliser	No reutilizar	Não reutilizar
	Consulter le mode d'emploi	Consultar las instrucciones de uso	Consultar as instruções de utilização
	Tampon de lavage concentré (20x)	Concentrado de amortiguador para lavado (20x)	Tampão de lavagem concentrado (20x)
	Tampon de dilution d'échantillon concentré (5x)	Concentrado de amortiguador para dilución de muestras (5x)	Tampão de diluição da amostra concentrado (5x)
	Tampon d'extraction de selles (2.5 x)	Amortiguador para extracción fecal (2.5x)	Tampão de extração de fezes (2.5x)
	Témoin	Blanco	Solução em branco
	Calibrateurs 1-5	Calibradores 1-5	Calibradores 1 a 5
	Contrôle faible	Control bajo	Controlo baixo
	Contrôle fort	Control alto	Controlo alto
	Conjugué	Conjugado	Conjugado
	Substrat	Sustrato	Sustrato

BIOHIT Calprotectin ELISA kit 602 260

INSTRUCTIONS FOR USE..... 6

KÄYTTÖOHJE..... 24

INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE..... 43

MANUEL D'INSTRUCTION..... 61

INSTRUCCIONES DE USO..... 81

INSTRUÇÕES DE USO..... 101

REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS..... 120

ORDERING INFORMATION / TILAUSTIEDOT / BESTÄLLNINGSINFORMATION / INFORMATION CONCERNANT LA COMMANDE / INFORMACIÓN DE PEDIDOS / INFORMAÇÕES PARA COMPRA..... 122

INSTRUCTIONS FOR USE

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Cat. No. 602 260

1. INTENDED USE 6
2. BACKGROUND 6
3. PRINCIPLE OF THE TEST 7
4. MATERIALS 8
4.1. Reagents supplied with the kit 8
4.2. Materials supplied with the kit 9
4.3. Materials required but not supplied 9
5. STABILITY AND STORAGE 9
6. REAGENT PREPARATION 10
6.1. Coated microtiter plate strips 10
6.2. Sample Dilution Buffer 10
6.3. Washing Buffer 10
6.4. Fecal Extraction Buffer 10
6.5. Calibrators, blank and controls 11
6.6. Conjugate Solution 11
6.7. Substrate Solution 11
7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION 11
7.1. Fecal samples 11
7.1.1. Extraction using the BIOHIT Extraction tubes 12
7.1.2. Extraction using the weighing method 12
7.2. Plasma and serum samples 13
8. SUGGESTED PLATE LAYOUT 13
9. TEST PROCEDURE 14
9.1 Procedural Notes 14
9.2 ELISA Procedure 14
10. RESULTS 15
10.1 Quality Control Values 15
10.2 Calculation of the results 16
10.3 Interpretation of the results 17
11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE 18
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS 18
13. WARNINGS AND PRECAUTIONS 20
13.1 Disposal Considerations 21
14. WARRANTY 21
15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE 22

1. INTENDED USE

The **BIOHIT Calprotectin ELISA** is a quantitative method for the detection of Calprotectin in stool samples. It can be used as an aid in identifying organic disease of the small intestine, large bowel or the stomach in patients, to determine the disease activity and monitor the response to treatment in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. The **BIOHIT Calprotectin ELISA** has been validated for stool samples. **The test is for *in vitro* diagnostic use.**

2. BACKGROUND

Calprotectin is a 36 kilodalton calcium and zinc-binding protein[1)] released specially from leukocytes, in particular polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMN), to the gut lumen during intestinal mucosal inflammation. Micro-organisms of the bowel stimulate leukocytes to migrate into the gut lumen where they release their contents including antimicrobial substances like Calprotectin. This protein constitutes about 60% of total proteins in the cytoplasm of PMNs [2)] and can be reliably estimated in fecal samples stored for up to seven days at ambient temperature [3)].
Different types of disease, for instance bacterial infections, rheumatoid arthritis and cancer, lead to activation of PMNs and increased levels of Calprotectin in plasma, cerebrospinal fluid, synovial fluid, crevicular fluid, urine or other human materials [4)].

The concentration of Calprotectin in feces is correlated with the number of PMNs migrating into the gut lumen [5)], and can be detected reliably even in small (less than one gram) random stool samples [3,6)]. Organic diseases of the bowel give a strong Calprotectin signal, i.e. elevations are regularly five to several thousand times the upper reference in healthy individuals [3,7-9)], indicating intestinal inflammation. Inflammatory bowel diseases (IBD), i.e. ulcerative colitis and Crohn's disease, may appear from early childhood to late adulthood and the diagnosis is often delayed due to vague symptoms or reluctance to perform endoscopy and biopsy. The **BIOHIT Calprotectin ELISA** can contribute to an earlier diagnosis of IBD since the test is usually positive in active IBD.

Functional disorders like irritable bowel syndrome (IBS) do not cause increased fecal Calprotectin concentrations, but organic abdominal disorders like IBD do. Patients with organic and functional abdominal disorders may have similar symptoms, and clinical examination alone may not be sufficient to give a specific diagnosis. A test for fecal Calprotectin

is a simple, non-invasive, inexpensive and objective method that can help selecting patients for additional examination like endoscopy. Abdominal symptoms are very common both in children and adults and a negative result as measured by the **BIOHIT Calprotectin ELISA** can with high probability rule out inflammatory bowel disorders [7].

Mucosal healing is the optimal goal for IBD treatment, and a test for fecal Calprotectin shows when this has been achieved. Many IBD patients in clinical remission with normal C-reactive protein (CRP) levels still have on-going inflammation [10], reflected by increased fecal Calprotectin. Such patients have increased risk of relapse within a few months [11]. If mucosal healing can be achieved, the risk of relapse and need for major abdominal surgery will be reduced [12,13]. Normalisation of Calprotectin levels means that mucosal healing has been achieved [14]. Our Calprotectin ELISA technology has also been used for analysis of serum and plasma samples, and high Calprotectin levels have been found in patients with bacterial infections [15,16], sepsis and inflammatory conditions like rheumatoid arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [17-21]. Scientific papers show that Calprotectin in serum/plasma is a superior marker of disease activity in RA and SLE and can predict flares. It is also a good marker of acute coronary artery events leading to myocardial infarction [22-24].

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The BIOHIT Calprotectin ELISA is based upon preparation of an extract of feces using Fecal Extraction Buffer. The level of Calprotectin is determined by testing the extract in an enzyme-linked immunoassay (ELISA) specific for Calprotectin.

In the ELISA, samples and calibrators are incubated in separate microtiter wells coated with monoclonal antibodies which bind the Calprotectin. After incubation and washing of the wells, bound Calprotectin is allowed to react with enzyme-labelled, immunoaffinity-purified Calprotectin-specific antibodies. After this reaction, the amount of enzyme bound in the microtiter wells is proportional to the amount of Calprotectin in the sample or calibrator, which is determined by incubation with a substrate for the enzyme giving a colored product. The color intensity is determined by absorbance using an ELISA plate reader and is proportional with the concentration of Calprotectin in the calibrators and samples. The assay is calibrated using Calprotectin purified from leukocyte extract.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied with the kit

Coated Microtiterplate: 12 strips, 8 wells per strip, coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. The plate is stored in a sealed bag with desiccant.

DILBUF 5x **Sample Dilution Buffer (5x conc.) *****: 1 x 20 mL, 5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, yellow colored solution, bottle with blue cap.

WASH 20x **Washing Buffer (20x conc.) ***: 1 x 50 mL, 20x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water, for washing the microtiter wells; pH 7,8 ± 0.2, clear solution, bottle with white cap.

FEC EXTRBUF 2.5X **Fecal Extraction Buffer (2.5x conc.) ****: 2 x 90 mL, 2.5x concentrate, to be diluted with distilled/deionised water; pH 8.0 ± 0.2, clear solution, bottles with white caps.

CAL 1-5 **Calprotectin Calibrators and *****: 6 vials with 1.0 mL, ready to use; yellow colored solution, vials with different colored caps:

Blank: Blue cap	0	ng/mL
Calibrator 1: Green cap	7.8	ng/mL
Calibrator 2: Yellow cap	31.3	ng/mL
Calibrator 3: Red cap	62.5	ng/mL
Calibrator 4: White cap	125	ng/mL
Calibrator 5: Black cap	500	ng/mL

CONTROL LOW CONTROL HIGH **Controls "Low" and "High" *****: 2 vials one tube each with 1.0 mL, ready to use, yellow colored solution; Ctr Low: vial with brown cap;.Ctr High: vial with purple cap.

CONJ **Conjugate Solution******: 13 mL alkaline phosphatase-labelled, immunoaffinity-purified polyclonal rabbit antibodies against Calprotectin, ready to use; red colored solution, 25 mL Dynex reagent tube with white cap.

SUBS **Substrate Solution (pNPP)**: 13 mL, ready to use; clear to faint yellow solution, opaque bottle with yellow cap. The bottle contains stabilising pellets.

Note: If using a Dynex instrument, the substrate has to be transferred into a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

*	Contains 0.1 % Kathon
**	Contains <0.1% sodium azide
***	Contains 0.1 % Kathon and <0.1% sodium azide
****	Contains 0.02% methylisothiazolone and 0.02% bromonitrodioxane

4.2. Materials supplied with the kit

- 2 Sealing foils
- 1 Test protocol
- 1 Plate layout

4.3. Materials required but not supplied

- Distilled/deionised water
- Extraction devices (see section 7.1.1 and 7.1.2)
- Disposable, breakable inoculation loops (if using weighing method in section 7.1.2)
- Sensitive digital scale (40 – 150 mg) (if using weighing method in section 7.1.2)
- Disposable polystyrene screw cap tubes, 5 mL (if using weighing method in section 7.1.2)
- Vortex mixer
- Disposable tubes for dilution of samples: Eppendorf tubes or similar (if assay is performed manually)
- Pipettes to deliver volumes 10 – 1000 µL (if assay is performed manually)
- Repetitive pipette or multi-channel pipette, 100 µL (if assay is performed manually)
- Microplate well washer or multi-channel pipette, 300 µL (if assay is performed manually)
- Plate shaker (500 – 700 rpm) (if assay is performed manually)
- Timer (if assay is performed manually)
- Microplate reader, filter 405 nm (if assay is performed manually)
- 1M NaOH (stop solution; optional)

5. STABILITY AND STORAGE

When stored unopened at 2 – 8°C, kit reagents are stable up to the expiry date stated on the label.

Opened plates, reagents and concentrated buffers are stable for up to

three months when stored at 2 – 8°C.

When prepared in clean vessels, working solutions (1x) of Washing Buffer, Sample Dilution Buffer and Fecal Extraction Buffer can be stored at 2 – 8°C for up to one month.

Avoid exposure to high temperature and direct sunlight.

6. REAGENT PREPARATION
All reagents, samples and controls should be brought to room temperature (18 – 25°C) before starting the test run.

6.1. Coated microtiter plate strips
The ready-to-use plate strips are coated with affinity-purified monoclonal mouse antibodies specific for Calprotectin. Unused strips should be removed from the frame and immediately re-sealed in the aluminium foil pouch along with the desiccant supplied. Store at 2 – 8°C.

6.2. Sample Dilution Buffer
Dilute the 5x concentrated Sample Dilution Buffer by adding 1 part (20 mL) to 4 parts (80 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 100 mL. Mix well. Store the diluted Sample Dilution Buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

Note: If using a Dynex DS2 or DSX ELISA automat, the Sample Dilution Buffer must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test.

6.3. Washing Buffer
Dilute the 20x concentrated Washing Buffer by adding 1 part (50 mL) to 19 parts (950 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 1000 mL. Mix well. Store the diluted Washing Buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

6.4. Fecal Extraction Buffer
Dilute the 2.5x concentrated Fecal Extraction Buffer by adding 1 part (90 mL) to 1.5 parts (135 mL) distilled/deionised water in a clean vessel to a final volume of 225 mL. Mix well. Store the diluted buffer in a closed vessel at 2 – 8°C.

6.5. Calibrators, blank and controls
The vials labelled with blank, calibrator, as well as the controls, contain 1.0 mL each of a ready-to-use solution. The concentration of Calprotectin is printed on the label of each vial. The vials fit directly into Dynex DS2 and DSX ELISA automates.

6.6. Conjugate Solution
The tube contains 13 mL of alkaline phosphatase (AP)-labelled, immunoaffinity-purified rabbit antibodies against Calprotectin in a buffer with stabilisers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. The tube fits directly into Dynex DS2 and DSX ELISA automates.

6.7. Substrate Solution
The bottle contains 13 mL of p-nitrophenylphosphate (pNPP) solution. The solution is ready to use and must be stored in its original, opaque bottle.

Note: If using a Dynex DS2 or DSX ELISA automat, the Enzyme Substrate Solution must be transferred to a 25 mL Dynex reagent tube before running the test. Avoid transferring the stabilising pellets.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION
The **BIOHIT Calprotectin ELISA** has been developed and validated mainly for fecal samples, but can also be used for plasma/serum samples.

7.1. Fecal samples
Since Calprotectin is very stable in stools, patients can collect small fecal samples at home. Collect 1 – 5 g (approximately one teaspoonful), place it in a suitable clean container and deliver it to the laboratory as soon as possible but within four days. When put in a container approved for transport, it can be sent by ordinary mail, i.e. no refrigeration is needed. Exposure to temperatures above 30°C should be avoided.

Samples can also be stored frozen, at -20°C or lower, until delivery or mailing. Frozen samples must be thawed and equilibrated to room temperature before extraction and testing. Note that freezing fecal samples can in some cases result in increased Calprotectin levels, most likely due to release from granulocytes.

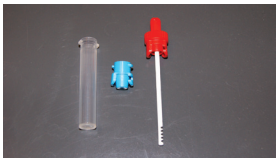
Note: Before commencing extraction, the stool sample should be homog-

enised well using, for example, a spatula, before the small amount for extraction is taken out.

For extraction, we recommend the use of BIOHIT Extraction tubes or the other method described below (chapter 7.1.1 and 7.1.2). Perform extraction according to package insert for the chosen extraction device/method. Other methods and devices, validated by the customer, can be used.

7.1.1. Extraction using the BIOHIT Extraction tubes

Instructions for use: please read package insert for product Ref. 602 270.



7.1.2. Extraction using the weighing method (without extraction device)

1. Weigh (tare) an empty screw cap tube with an inoculation loop.
2. Take out approx. 100 mg (between 40 and 120 mg) feces by means of the inoculation loop and place it into the screw cap tube. Avoid taking out solid, undigested material like fibres and seeds.
3. Weigh tube and loop with feces which will give the net feces weight.
4. Break or cut off the top half of the loop handle and leave the bottom part inside the tube.
5. Add extraction buffer to a weight: volume ratio 1:50, for instance 4.9 mL buffer to 100 mg feces. Close the tube.
6. Mix vigorously for 30 seconds by means of a vortex mixer.
7. Continue the mixing on a shaker (at approx. 1000 rpm) for 30±5 minutes with the loop inside the tube as an agitator.
8. Allow a couple of minutes on the bench for particles to settle and pipette carefully from the top of the tube. No centrifugation is necessary, but a short centrifugation can be performed if a particle-free solution is required.
9. The extract, which represents a 1:50 dilution (weight:volume) of the stool sample, is now ready for dilution and testing.
10. For storage, transfer about 0.5 mL to a new tube. Extracts can be

stored at 2 – 8°C for at least five days or frozen below -20°C for up to 2 years.

7.2. Plasma and serum samples

True levels of Calprotectin in serum or plasma require that the protein is not released from neutrophil granulocytes in blood *in vitro*. For plasma, EDTA is the preferred anticoagulant.

Recommended sample preparation procedure:

1. Collect blood using vacutainers.
2. Centrifuge the blood at 3000 rpm for 10 minutes as soon as possible and no longer than three hours after sampling.
3. Harvest only the upper two-thirds of the serum or plasma layer by careful pipetting so that leucocytes from the buffy coat are not aspirated.

For ELISA, dilute the plasma or serum 1:20 (e.g. 50 mL sample + 950 mL Sample Dilution Buffer) and follow the assay procedure described in Section 9.

8. SUGGESTED PLATE LAYOUT

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrator 5 500 ng/mL	Calibrator 5 500 ng/mL	Sample 1	Sample 1		
B	Calibrator 4 125 ng/mL	Calibrator 4 125 ng/mL	Sample 2	Sample 2		
C	Calibrator 3 62.5 ng/mL	Calibrator 3 62.5 ng/mL	Sample 3	Sample 3		
D	Calibrator 2 31.3 ng/mL	Calibrator 2 31.3 ng/mL	Sample 4	Sample 4		
E	Calibrator 1 7.8 ng/mL	Calibrator 1 7.8 ng/mL	Sample 5	Sample 5		
F	Blank 0 ng/mL	Blank 0 ng/mL	Sample 6	Sample 6		
G	Control “Low”	Control “Low”	Sample 7	Sample 7		
H	Control “High”	Control “High”	Sample 8	Sample 8		

Suggested ELISA plate layout for calibrators, controls and samples using

manual procedure. Duplicate wells are recommended for increased reliability of results. A full plate takes 40 samples.

9. TEST PROCEDURE

The following procedure is for manual testing. Validated protocols for Dynex DS2 and DSX ELISA automates are available upon request. Please note that the calibrator, blank and positive control vials, as well as the conjugate tube, fit directly into the DS2 or DSX ELISA automates. Other automated ELISA instruments can also be used, but have to be validated by the customer.

9.1 Procedural Notes

- Preparation: Please read the test protocol carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, a plate layout for all blanks, calibrators, controls and samples should be carefully established, using, for example, the sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips. Unused strips should be re-sealed in the aluminium pouch and stored as described in Section 6.1.
- A 1:100 dilution of feces extracts is recommended. This dilution will give sample results between 25 mg/kg (LoQ) and 2500 mg/kg in feces. Extracts with higher Calprotectin values can be diluted more (> 1:100) and re-tested if a value is required. Extracts with low Calprotectin values can be diluted less (1:50). The adjusted dilution factor must be taken into account when converting from ng/mL to mg/kg (see section 11 below).
- Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.
- A clean, disposable pipette tip must be used for dispensing each calibrator, control and sample.
- To achieve the most reliable results, blanks, calibrators, controls and patient samples should always be run in duplicate.
- All samples and kit reagents should be equilibrated to room temperature (18 – 25°C) before testing is begun.

9.2 ELISA Procedure

1. Dilute feces extract samples 1:100 (e.g. 10 µL sample + 990 µL Sample Dilution Buffer) and mix well by vortexing.
2. Add 100 µL of each blank, calibrator, control and diluted sample in duplicate wells; see recommended plate layout in Section 8.

3. Cover the plate with a sealing foil and incubate at room temperature for 40±5 min*) on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
4. At the end of the incubation time, remove the liquid and wash the wells by adding 300 µL Washing Buffer to each well. Remove as much liquid as possible and repeat until a total of three washings have been performed. If a plate washer is used, check that all aspirating and filling probes are unblocked to ensure efficient washing of all wells. After the final wash, invert the plate and tap the well openings thoroughly on absorbent tissue to remove any remaining Washing Buffer.
5. Mix the content of the Conjugate vial gently prior to use (do not shake). Add 100 µL of conjugate to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
6. Cover the plate with sealing foil and incubate at room temperature for 40±5 min*) on a horizontal plate shaker (approximately 500 – 700 rpm).
7. Repeat the washing steps as described above, three times with 300 µL Washing Solution per well.
8. Add 100 µL Substrate Solution to each well, preferably using a repetitive or multichannel pipette.
9. Incubate the plate at room temperature (without shaking) for 20 – 30 minutes, protected from light.
10. Optional: Add 100 µL 1M NaOH stop solution to each well if a fixed incubation period is required.
11. Read the optical density (OD) values at 405 nm using an ELISA reader. If the plate reader has this option, shake the plate briefly (2-3 seconds) before reading.

*) **Optional: Reduced incubation time (manual procedure).** The incubation time can be reduced to 30±5 min without changing the results. A reduction in OD values may be observed, and the maximum OD value for the top standard (500 ng/mL) may fall below the recommended 1.800 but this does not affect the results.

10. RESULTS

10.1 Quality Control Values

- A new standard curve must be included in each run.
- The positive controls should be included in each run. The value of the controls should be within the limits printed on the vial labels.
- As a guide, the OD value of Calibrator 5 (500 ng/mL) should be ≥ 1.6 and the OD value of Blank (0 ng/mL) should be ≤ 0.25. A representative

calibration curve is shown in figure 1.

10.2 Calculation of the results
Calculation of Calprotectin concentration in patient fecal samples:

1. Calculate the mean OD values of all duplicate wells (blank, calibrators, and samples).
2. Plot the value of blank and each calibrator concentration (ng/mL) on the x axis against its mean OD value on the y axis to obtain a calibration curve. **A 4-parameter curve fit function is recommended** (see figure 1 below). If a logarithmic x axis is required, a value of 0.001 ng/mL must be used for standard A (0 ng/mL).
3. Use the calibration curve to determine the Calprotectin concentration in the diluted samples (ng/mL) based on their OD values.
4. **Multiply the Calprotectin concentration (ng/mL) in the diluted fecal extracts by 5 in order to convert to mg/kg Calprotectin in the original stool sample.**

This factor corrects for the total dilution of 1:5000 (1:50 during the extraction procedure and the following 1:100 dilution of the extracts) and converts the value from ng/mL to mg/kg.

Example: if a diluted extract sample has a value of 100 ng/mL the concentration in the original stool specimen was 100 x 5 = 500 mg/kg.

Note: If extracts have been diluted more (or less) than the recommended 1:100, the additional dilution factor must be entered into the calculation.

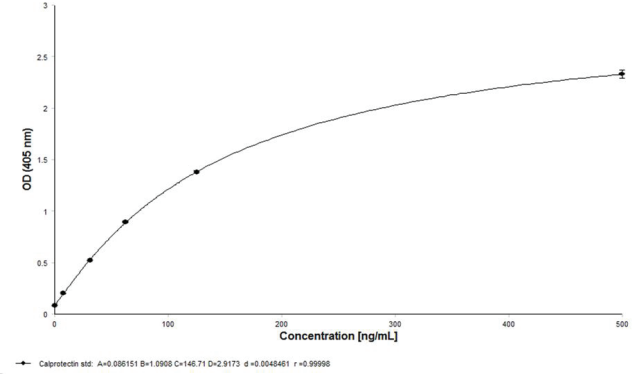


Figure 1: A representative calibration curve using 4-parameter curve fit.

10.3 Interpretation of the results

The following Calprotectin values in stool samples have been reported in the published literature [3, 25]):

Normal value	5 – 50 mg/kg
Positive value	> 50 mg/kg
Median value in patients with symptomatic colorectal cancers	350 mg/kg
Active, symptomatic inflammatory bowel disease	200 – 40 000 mg/kg

Note that a diagnosis should not be established based on a single test result. Diagnosis should take into consideration clinical history and symptoms.

The following Calprotectin values were found in blood from 100 healthy blood donors (50 men and 50 women):

Sample type:	**Mean (µg/L):**	**SD:**
EDTA plasma	627	307

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established based on a single test result.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Note: All design verification studies were performed by manual testing on feces extract samples (diluted 1:100) or EDTA plasma samples (diluted 1:20), using the ELISA procedure described in Section 9.

Inter-assay and intra-assay precision from feces extracts, and intra-assay precision from EDTA plasma:

Inter-assay precision, feces extracts*		Intra-assay precision, feces extracts**		Intra-assay precision, EDTA plasma***	
Concentration in feces (mg/kg)	% CV	Concentration in feces (mg/kg)	% CV	Concentration in plasma (µg/L)	% CV
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

*Mean results from three different laboratories, each testing two different kit lots: six samples were tested a total of 10 times over five days
** Mean results from three different laboratories, each testing two kit lots: six samples were tested with 10 replicates in one run
*** Tested using one kit lot; six samples were diluted 1:20 and tested with 10 replicates in one run

Recovery:
Feces: 85 – 105%; tested with fecal extract spiked with purified Calprotectin at five different levels.
Plasma: 81 – 105%; tested with plasma spiked with purified Calprotectin at five different levels.

Limit of Quantification:
5 ng/mL; tested with feces extract, plasma and purified Calprotectin. Samples were analysed five times over five days. The mean CV for the different samples and determinations at this level was 12%.

Limit of Detection:
< 5 ng/mL; calculated as mean (Sample Dilution Buffer; n= 32) + 5x SD.

Interference
No observed interference on the ELISA from commonly used pharmaceuticals: Prednisolon, Imurel, Salazopyrin and Ciprofloxacin.

Extraction precision
Two feces samples were extracted 10 times each, using the procedure described in section 7.1.2, and the extracts analysed in the ELISA. Mean results from three different laboratories and one kit lot:

Sample	Concentration (mg/kg)	% CV
Low	130	8.7
High	1357	8.8

Linearity, fecal extracts
Fecal extracts (n=10) were diluted 1:100 – 1:1000 and analysed in the ELISA. Mean results:

Dilution	% of 1:100 dilution
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Note that sample variation in linearity has been observed.

Linearity, EDTA plasma
Plasma samples (n=5) were diluted 1:20 – 1:80 and analysed in the ELISA. Mean results:

Dilution	% of 1:20 dilution
1:20	100
1:40	107
1:80	116

Note that sample variation in linearity has been observed.

13. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC, the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performance and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and the warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analysers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for *in vitro* diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and hepatitis B antigen (Bag) and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- Do not use reagents from other manufacturers with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label or after 1 month of preparation of concentrated reagents to working solutions.
- Use only clean pipette tips, dispensers and lab ware.
- To prevent cross-contamination, do not interchange screw caps of reagent vials.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.

- After first opening and subsequent storage, check conjugate, calibrators and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results, pipette calibrators, control and fecal extract samples, and dispense conjugate and substrate, accurately to the bottom of microplate wells, without splashing.
- Some reagents contain sodium azide at less than 0.1% (w/v) and/or 0.1% Kathon.
- Store the substrate solution in the original, opaque bottle; the solution should be clear to pale yellow. Mix gently before use.
- The **BIOHIT Calprotectin ELISA** is designed for use by qualified personnel who are trained in good laboratory practice.

13.1 Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose of hazardous waste.

14. WARRANTY

Biohit shall remedy all defects discovered in any Product (the “Defective Product”) that result from unsuitable materials or negligent workmanship and which prevent the mechanical functioning or intended use of the Products including, but not limited to, the functions specified in Biohit’s specifications for the Products. ANY WARRANTLY WILL, HOWEVER, BE DEEMED AS VOID IF FAULT IS FOUND TO HAVE BEEN CAUSED BY MALTREATMENT, MISUSE, ACCIDENTAL DAMAGE, INCORRECT STORAGE OR USE OF THE PRODUCTS FOR OPERATIONS OUTSIDE THEIR SPECIFIED LIMITATIONS OR OUTSIDE THEIR SPECIFICATIONS, CONTRARY TO THE INSTRUCITONS GIVEN IN THE INSTRUCTION MANUAL. The period of this warranty is defined in the instruction manual of the Products and will commence form the date the relevant Product is shipped by Biohit. This Biohit Diagnostic kit has been manufactured according to ISO 9001 / ISO 13485 quality management protocols. In case of interpretation disputes the English text applies.

15. SHORT OUTLINE OF THE PROCEDURE

BIOHIT Calprotectin ELISA kit for analysis of Calprotectin in feces
Please refer to sections 7 – 9 in the package insert for a full description of the practical steps and for analysis of plasma/serum.

Extraction
Perform extraction according to one of the methods described in section 7.1.1 – 7.1.2

ELISA (manual procedure)
- Dilute fecal extracts 1:100 in Sample Dilution Buffer
- Add 100 µL calibrators, controls, blank and samples to the ELISA plate
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min*)
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Buffer
- Add 100 µL of Conjugate solution to each well
- Incubate on a plate shaker at room temperature for 40±5 min*)
- Wash the wells three times with 300 µL Washing Buffer
- Add 100 µL Substrate Solution to each well
- Incubate under cover for 20 – 30 min
- Optional: add 100 µL 1M NaOH to each well
- Read the OD values at 405 nm using an ELISA reader
- Using a 4-parameter curve fit, calculate the results (ng/mL)
- mg/kg in feces = ng/mL × 5

*) can be reduced to 30±5 min if the assay is run manually.

For questions, please contact: info@biohit.fi

KÄYTTÖOHJE

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Kat. nro. 602 260

1.KÄYTTÖTARKOITUS 24
2. TAUSTA 24
3. TESTIN PERIAATE 25
4. MATERIAALIT 26
4.1. Pakkaukseen sisältyvät reagenssit 26
4.2. Pakkaukseen sisältyvät materiaalit 27
4.3. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen 27
5. SÄILYVYYS JA SÄILYTYS 28
6. REAGENSSIEN VALMISTAMINEN 28
6.1. Päällystetyn kuoppalevyn liuskat 28
6.2. Näytteen laimennuspuskuri 28
6.3. Pesupuskuri 28
6.4. Ulostenäytepuskuri 29
6.5. Kalibraattorit, 0-näyteliuos ja kontrollit 29
6.6. Konjugaattiliuos 29
6.7. Substraattiliuos 29
7. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA VALMISTELEMINEN 29
7.1. Ulostenäytteet 29
7.1.1. Uuttaminen BIOHIT-uuttamisputkien avulla 30
7.1.2. Uuttaminen punnitusmenetelmällä (ilman uuttamislaitetta) 30
7.2. Plasma- ja seeruminäytteet 31
8. SUOSITELTU LEVYN PIPETOINTIKAAVIO 32
9. TESTIMENETELMÄ 32
9.1 Menetelmiä koskevia huomioita 32
9.2 ELISA-menetelmä 33
10. TULOKSET 34
10.1 Kalibroidut kontrollien raja-arvot 34
10.2 Tulosten laskenta 34
10.3 Tulosten tulkinta 36
11. TOIMENPITEEN RAJOITUKSET 36
12. TESTIN SUORITUSARVOT 36
13. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET 38
13.1 Huomioitava hävitettäessä 40
14. TAKUU 40
15. TESTIN LYHYT KUVAUS 41

1.KÄYTTÖTARKOITUS

BIOHIT kalprotektiini ELISA on kvantitatiivinen menetelmä kalprotektiinin määrittämiseen ulostenäytteistä. Sitä voidaan käyttää apuna ohutsuolen, paksusuolen tai mahalaukun elimellisen taudin tunnistamisessa, taudin aktiivisuuden määrittämisessä ja hoitovasteen seurannassa, kuten Chronin taudissa ja haavaisessa paksusuolitulehduksessa. **BIOHIT kalprotektiini ELISA** on validoitu käytettäväksi ulostenäytteiden tutkimukseen. **Testi on tarkoitettu *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.**

2. TAUSTA

Kalprotektiini on 36 kilodaltonin kokoinen kalsiumia ja sinkkiä sitovaa proteiini[1)] jota vapautuu erityisesti leukosyyteistä, tarkemmin polymorfonukleaarisista neutrofiilisistä granulosyyteistä (PMN) suolen luumeniin suoliston limakalvon tulehduksen aikana. Suolen mikro-organismit stimuloivat leukosyyttejä siirtymään suolen luumeniin, missä ne vapauttavat sisältönsä, johon kuuluu mikrobeja tappavia aineita, kuten kalprotektiinia. Tämä proteiini muodostaa noin 60 % kaikista PMN:n soluliman proteiineista [2)] ja sen määrä voidaan luotettavasti arvioida ulostenäytteistä, joita on säilytetty korkeintaan seitsemän päivää huoneenlämmössä [3)].
Erityyppiset sairaudet, esimerkiksi bakteeri-infektiot, nivelreuma ja syöpä, johtavat PMN:n aktivoitumiseen ja lisäävät kalprotektiinin määrää solulimassa, selkäydinnesteessä, nivelnesteessä, ientaskunesteessä, virtsassa tai muissa kehon nesteissä [4)].

Ulosteen kalprotektiinipitoisuus korreloi suolen luumeniin siirtyneiden PMN:en lukumäärän kanssa [5)] ja pitoisuus voidaan määrittää luotettavasti myös pienistä (alle gramman painoisista) satunnaisista ulostenäytteistä [3,6)]. Suoliston elimelliset taudit jättävät selkeän suolistotulehduksesta kertovan kalprotektiinijäljen; tyypillisesti kalprotektiinin arvot nousevat viisi- tai monituhatkertaisiksi siitä, mitä terveiden henkilöiden arvot enimmillään ovat[3,7.9)]. Tulehdukselliset suolistosairaudet (IBD), kuten haavainen paksusuolitulehdus ja Crohnin tauti, voivat esiintyä varhaislapsuudesta myöhäiseen aikuisikään asti ja diagnoosia viivästyttävät usein vaikeaselkoiset oireet tai vastahakoisuus endoskopian ja biopsian suorittamiseen. **BIOHIT kalprotektiini ELISA** voi täydentää aiempaa diagnoosia tulehduksellisesta suolistosairaudesta (IBD), sillä testi on positiivinen aktiivisen IBD:n yhteydessä.

Toiminnalliset häiriöt, kuten ärtyvän suolen oireyhtymä (IBS), eivät aiheu-

ta lisääntynyttä kalprotektiinin pitoisuutta ulosteessa, toisin kuin IBD. Potilailla, joilla on elimellinen tai toiminnallinen vatsavaiva, voi olla samankaltaisia oireita, ja pelkkä kliininen tutkimus ei välttämättä riitä oikean diagnoosin varmistamiseen. Kalprotektiinin testaaminen ulosteesta on yksinkertainen, ei-invasiivinen, edullinen ja objektiivinen tapa valikoida potilaita lisätutkimuksiin, kuten endoskopiaan. Vatsan oireilu on hyvin tavallista sekä lapsilla että aikuisilla ja **BIOHIT kalprotektiini ELISA** -testillä mitatut negatiiviset tulokset voivat suurella todennäköisyydellä auttaa poissulkemaan tulehdukselliset suolistosairaudet [7)].

Limakalvon parantuminen on onnistuneen IBD:n hoidon tavoite ja kalprotektiinin testaus ulosteesta kertoo, milloin tämä tavoite on saavutettu. Monilla IBD-potilailla on kliinisen toipumisjakson aikana normaalit C-reaktiivisen proteiinin (CPR) tasot, mutta heillä on silti jatkuva tulehdus, [10)], joka näkyy kalprotektiinin määrän kasvuna ulosteessa. Näillä potilailla IBD:n uusiutumisriski seuraavien kuukausien aikana on korkea [11)]. Jos limakalvo paranee, uusiutumisriski ja merkittävän suolistoleikkauksen tarve pienenevät [12,13)]. Kalprotektiinin tason normalisoituminen merkitsee sitä, että limakalvon paraneminen on alkanut [14)]. Kalprotektiini ELISA-teknologiaa on käytetty myös seerumi- ja plasmanäytteiden analysointiin ja korkeita kalprotektiiniarvoja todettiin myös potilailta, joilla on bakteeri-infektio, [15, 16)], sepsis tai muu tulehdussairaus, kuten nivelreuma (RA) tai systeeminen lupus erythematosus (SLE) [17–21)]. Tieteelliset tutkimukset osoittavat, että kalprotektiini seerumissa/plasmassa on ensisijainen mittari RA:n ja SLE:n aktiivisuuden toteamisessa ja se voi ennustaa taudin puhkeamista. Se on myös hyvä sydäninfarktiin johtavan sepelvaltimotaudin mittari [22–24)].

3. TESTIN PERIAATE

BIOHIT kalprotektiini ELISA-testi perustuu ulostenäytteen käsittelyyn eristyspuskurin (Fecal Extraction Buffer) avulla. Kalprotektiinipitoisuus määritetään entsyymi-immunologisella menetelmällä (ELISA), joka on kalprotektiinille spesifinen.

ELISA-testissä näytteet ja kalibraattorit inkuboidaan erillisillä kuoppalevyillä, jotka on päällystetty kalprotektiinia sitovilla monoklonaalisilla vasta-aineilla. Inkuboinnin ja kuoppalevyjen pesun jälkeen sitoutuneen kalprotektiinin annetaan reagoida entsyymillä leimatun, affiniteetti-puhdistetun kalprotektiinispesifisen vasta-aineen kanssa. Tämän reaktion jälkeen kuoppalevyyn sitoutuneen entsyymin määrä on verrannollinen

kalprotektiinin määrään näytteessä tai kalibraattorissa, mikä määritetään lisäämällä kuoppiin substraattia joka reagoi entsyymin kanssa muodostaen värireaktion. Värin intensiivisyys määritetään mittaamalla kuoppien absorbanssi käyttäen ELISA-lukijalaitetta. Intensiteetti on suoraan verrannollinen kalibraattorien ja näytteen kalprotektiinipitoisuuden kanssa. Analyysi kalibroidaan käyttämällä leukosyyttiuutteesta puhdistettua kalprotektiinia.

4. MATERIAALIT

4.1. Pakkaukseen sisältyvät reagenssit

Päällystetty kuoppalevy: 12 liuskaa, 8 kuoppaa liuskassa, päällystetty affiniteetti-puhdistetulla, monoklaanisella, kalprotektiinispesifisellä hiiren vasta-aineella. Levy on pakattu umpiopakattuun pussiin yhdessä kuivausaineen kanssa.

DILBUF 5x laimennuspuskurikonsentraatti (5x konsentraatti) ***:
1 x20 ml, 5x konsentraatti, laimennetaan tislatulla/deionisoidulla vedellä, pH 8,0 ± 0,2, keltainen liuos, pullossa sininen korkki.

WASH 20x pesupuskurikonsentraatti (20x konsentraatti) *:
1 x50 ml, 20x konsentraatti, laimennetaan tislatulla/deionisoidulla vedellä, kuoppalevyn pesuun, pH 7,8 ± 0,2, kirkas liuos, pullossa valkoinen korkki.

FEC EXTRBUF 2.5X ulostenäytepuskurikonsentraatti (2,5x konsentraatti) **: 2 x 90 ml, 2,5x konsentraatti, laimennetaan tislatulla/deionisoidulla vedellä, pH 8,0 ± 0,2, kirkas liuos, pulloissa valkoiset korkit.

CAL 1-5 kalprotektiinin kalibraattorit ja BLANK 0-näyteliuos***:
6 kpl 1,0 ml:n pulloja, käyttövalmis, keltainen liuos, ampulleissa eriväriset korkit:

Blank: Sininen korkki	0	ng/ml
Kalibraattori 1: Vihreä korkki	7.8	ng/ml
Kalibraattori 2: Keltainen korkki	31.3	ng/ml
Kalibraattori 3: Punainen korkki	62.5	ng/ml
Kalibraattori 4: Valkoinen korkki	125	ng/ml
Kalibraattori 5: Musta korkki	500	ng/ml

CONTROL LOW CONTROL HIGH Matala ja korkea kontrolli ***: 2 kpl 1,0 ml:n ampullia, käyttövalmiita, keltainen liuos, matala kontrolli: ampulli, jossa ruskea korkki, korkea kontrolli: ampulli, jossa violetti korkki.

CONJ **Konjugaattiliuos******: 13 ml emäksistä fosfataasi-leimattua, affiniteetti- puhdistettua polyklonaalista kanin kalprotektiini vasta-ainetta, käyttövalmis, punainen liuos, 25 ml:n Dynex-reagenssiputki, jossa valkoinen korkki.

SUBS **Substraattiliuos (pNPP)**: 13 ml, käyttövalmis, kirkas tai vaaleankeltainen liuos, läpinäkymätön pullo, jossa keltainen korkki. Pullo sisältää stabiloivia pellettejä.
Huomautus: Jos käytät Dynex-automaattia, substraattiliuos tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista.

*	Sisältää 0,1 % Kathonia
**	Sisältää <0,1 % natriumatsidia
***	Sisältää 0,1 % Kathonia ja <0,1 % natriumatsidia
****	Sisältää 0,02 % metyyli-isotiatsolonia ja 0,02 % bromonitrodioksaania

4.2. Pakkaukseen sisältyvät materiaalit
- 2 sulkemiskalvoa
- 1 testin suoritusohje
- 1 levyn malli

4.3. Tarvittavat materiaalit, jotka eivät sisälly toimitukseen
- Tislattu/deionisoitu vesi
- Uuttamisvälineet (katso kohta 7.1.1 ja 7.1.2)
- Kertakäyttöiset, murrettavat inokulaatiosilmukat (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Herkkä digitaalivaaka (40–150 mg) (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Kertakäyttöiset, kierrekorkilla varustetut polystyreeniset näyteputket, 5 ml (jos käytetään kohdassa 7.1.2 mainittua punnitusmenetelmää)
- Vortex-sekoitin
- Kertakäyttöiset putket näytteiden laimentamiseen: Eppendorf-putket tai samankaltaiset (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Pipettejä, joiden tilavuus on 10–1000 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Pipetti tai monikanavainen pipetti 1000 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Mikrotiitterilevyjen pesuri tai monikanavainen pipetti 300 µl (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Levyn ravistelija (500–700 r/min) (jos analyysi tehdään manuaalisesti)

- Ajastin (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- Kuoppalevyn lukija, suodatin 405 nm (jos analyysi tehdään manuaalisesti)
- 1 M NaOH (pysäytysliuos, valinnainen)

5. SÄILYVYYS JA SÄILYTYS
Säilytettäessä avaamattomina 2–8 °C:ssa pakkauksen reagenssit pysyvät stabiileina etikettiin merkittyyn viimeiseen käyttöpäivään asti.
Levyt, reagenssit ja konsentroidut puskuriliuokset säilyvät avattuina kolme kuukautta säilytettynä 2–8 °C:ssa.

Pesupuskuriliuoskonsentraatin, laimennuspuskurikonsentraatin ja ulostenäytepuskurikonsentraatin työliuokset (1x) säilyvät kuukauden ajan säilytettynä 2–8 °C:ssa, kun ne valmistetaan puhtaisiin astioihin.

Vältä altistamista korkeille lämpötiloille ja suoralle auringonvalolle.

6. REAGENSSIEN VALMISTAMINEN
Kaikki reagenssit, näytteet ja kontrollit tulee tasapainottaa huoneenlämpöön (18–25 °C) ennen testin aloittamista.

6.1. Päällystetyn kuoppalevyn liuskat
Käyttövalmiit liuskat on päällystetty affiniteetti-puhdistetulla, monoklaanisella hiiren kalprotektiinivasta-aineella. Käyttämättömät liuskat tulee poistaa kehyksestä ja sulkea heti alumiinifoliopussiin kuivausaineen kanssa. Säilytys 2–8 °C:n lämpötilassa.

6.2. Näytteen laimennuspuskuri
Laimenna 5x näytteen laimennuspuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (20 ml) neljään osaan (80 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on 100 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu näytteen laimennuspuskurikonsentraatti suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

Huomautus: Jos käytät Dynex DS2- tai DSX ELISA -automaattia, laimennuspuskurikonsentraatti tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista.

6.3. Pesupuskuri
Laimenna 20x pesupuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (50 ml) 19

osaan (950 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on 1000 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu pesupuskuri suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

6.4. Ulostenäytepuskuri
Laimenna 2,5x ulostenäytepuskurikonsentraatti lisäämällä yksi osa (90 ml) 1,5 osaan (135 ml) tislattua/deionisoitua vettä puhtaaseen astiaan, jolloin liuosta on yhteensä 225 ml. Sekoita hyvin. Säilytä laimennettu puskurikonsentraatti suljetussa astiassa 2–8 °C:n lämpötilassa.

6.5. Kalibraattorit, 0-näyteliuos ja kontrollit
0-näyteliuos, kalibraattorit ja kontrollit sisältävät jokainen 1,0 ml käyttövalmista liuosta. Kalprotektiinipitoisuus on merkitty jokaisen pullon etikettiin. Pullot ovat yhteensopivia Dynex DS2- ja DSX ELISA -automaattien kanssa.

6.6. Konjugaattiliuos
Putki sisältää 13 ml emäksistä fosfataasi-leimattua (ALP), affiniteetti-puhdistettua kanin kalprotektiinivasta-ainetta puskurissa, jossa on stabilisaattoria, säilöntäaineita ja inaktiivista (inerttiä) punaista väriainetta. Liuos on käyttövalmista. Putki on yhteensopiva Dynex DS2- ja DSX ELISA -automaattien kanssa.

6.7. Substraattiliuos
Pullo sisältää 13 ml p-nitrofenyylifosfaattiliuosta (pNPP). Liuos on käyttövalmista ja se tulee säilyttää alkuperäisessä, läpinäkymättömässä pullossaan.

Huomautus: Jos käytät Dynex DS2- tai DSX ELISA -automaattia, entsyymisubstraattiliuosta tulee siirtää 25 ml:n Dynex-reagenssiputkeen ennen testin suorittamista. Vältä stabilisaattori-pellettien siirtämistä.

7. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA VALMISTELEMINEN
BIOHIT kalprotektiini ELISA -testi on kehitetty ja hyväksytty pääasiassa ulostenäytteiden tutkimiseen, mutta sitä voi käyttää myös plasma-/seeruminäytteisiin.

7.1. Ulostenäytteet
Koska kalprotektiini säilyy hyvin ulosteessa, potilaat voivat ottaa pienen näytteen kotioloissa. Ota 1–5 gramman (noin yksi teelusikallinen) näyte,

laita se sopivaan puhtaaseen astiaan ja toimita se mahdollisimman pian, viimeistään seuraavan neljän päivän aikana, laboratorioon. Jos näyte laitetaan hyväksyttyyn kuljetuspakkaukseen, näyte voidaan lähettää tavallisena postina, kylmäkuljetusta ei tarvita. Altistamista yli 30 °C:n lämpötiloille tulee välttää.

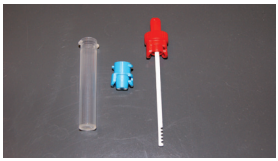
Näytteet voi säilyttää myös pakastettuina, –20 °C:ssa tai alhaisemmassa lämpötilassa, kunnes ne toimitetaan tai postitetaan. Pakastetut näytteet tulee sulattaa ja tasapainottaa huoneenlämpöön ennen uuttamista ja testausta. Vältä näytteen uudelleenpakastusta ja -sulatusta. Huomioi, että ulostenäytteen jäädyttäminen voi joissain tapauksissa johtaa kohonneisiin kalprotektiinipitoisuuksiin, todennäköisimmin granulosyyteistä vapautumisen seurauksena.

Huomautus: Ennen uuttamisen aloittamista uloste tulee homogenisoida hyvin esimerkiksi lastalla, ennen kuin pieni osa erotetaan uuttamista varten.

Suosittelemme BIOHIT-uuttamisputkien tai jonkin alla kuvatun menetelmän (kohdat 7.1.1 ja 7.1.2) käyttöä uuttamiseen. Tee uuttaminen pakkausselosteen ohjeen mukaisesti, sen mukaan mikä uuttamisväline tai –menetelmä on valittu. Myös muita asiakkaan validoimia menetelmiä tai laitteita voi käyttää.

7.1.1. Uuttaminen BIOHIT-uuttamisputkien avulla

Käyttöohjeet: Lue tuotteen Ref. 602 270 pakkausseloste.



7.1.2. Uuttaminen punnitusmenetelmällä (ilman uuttamislaitetta)

1. Punnitse tyhjä näyteputki (tyhjäpaino) yhdessä inokulaatiosilmukan kanssa.
2. Ota silmukan avulla noin 100 mg (40–120 mg) ulostetta ja aseta se kierrekorkilliseen näyteputkeen. Vältä kiinteiden, sulamatta jääneiden

materiaalien, kuten kuitujen ja siemenien ottamista.
3. Punnitse näyteputki ja silmukka yhdessä ulosteen kanssa, jolloin saat laskettua ulosteen nettopainon.
4. Murra tai leikkaa silmukan kädensijan yläosa irti ja jätä alaosa putkeen.
5. Lisää ulostenäytepuskuri painoon: määrän suhde 1:50, esimerkiksi 4.9 ml puskuria 100 mg:a ulostetta kohti. Sulje putki.
6. Sekoita voimakkaasti 30 sekunnin ajan vortex-sekoittimessa.
7. Jatka sekoitusta ravistimessa (noin nopeudella 1000 r/min) noin 30 ± 5 minuutin ajan. Silmukan tulee olla putken sisällä sekoituksen ajan.
8. Anna uutteen asettua muutaman minuutin ajan ja ota näytettä varovasti pipetillä näyteputken yläosasta. Sentrifugin käyttö ei ole tarpeellista, mutta lyhyt käsittely voidaan suorittaa, jos tarvitaan partikkelivapaa liuos.
9. Uute, joka edustaa ulostenäytteen laimennusta 1:50 (paino:määrä), on nyt valmis laimennusta ja testausta varten.
10. Siirrä noin 0.5 ml uutetta uuteen putkeen säilytystä varten. Uutteita voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa ainakin viiden päivän ajan tai jäädytettynä alle –20 °C:een kahden vuoden ajan.

7.2. Plasma- ja seeruminäytteet

Luotettava kalprotektiinipitoisuuden määrittäminen seerumista tai plasmasta edellyttää, että neutrofiiliset granulosyytit eivät vapauta proteiinia vereen in vitro. EDTA on suositeltu antikoagulantti plasmalle.

Suositeltu näytteenvalmistustapa:
1. Ota verinäyte käyttäen vacutainer-putkia.
2. Sentrifugoi veri mahdollisimman pian sentrifugissa kymmenen minuutin ajan nopeudella 3000 r/min, korkeintaan kolmen tunnin kuluttua näytteen ottamisesta.
3. Kerää vain kaksi kolmasosaa ylemmästä seerumi- tai plasmakerroksesta pipetillä varovasti niin, että leukosyytit buffy coat -kerroksesta eivät tule mukaan.

Laimenna plasma tai seerumi suhteessa 1:20 (esim. 50 µl näytettä + 950 µL näytteen laimennuspuskuria) ELISA-menetelmää varten ja seuraa osassa 9 kuvattuja analyysitoimenpiteitä.

8. SUOSITELTU LEVYN PIPETOINTIKAAVIO

	1	2	3	4	etc.	
A	Kalibraattori 5 500 ng/ml	Kalibraattori 5 500 ng/ml	Näyte 1	Näyte 1		
B	Kalibraattori 4 125 ng/ml	Kalibraattori 4 125 ng/ml	Näyte 2	Näyte 2		
C	Kalibraattori 3 62,5 ng/ml	Kalibraattori 3 62,5 ng/ml	Näyte 3	Näyte 3		
D	Kalibraattori 2 31,3 ng/ml	Kalibraattori 2 31,3 ng/ml	Näyte 4	Näyte 4		
E	Kalibraattori 1 7,8 ng/ml	Kalibraattori 1 7,8 ng/ml	Näyte 5	Näyte 5		
F	0-näyteliuos 0 ng/ml	0-näyteliuos 0 ng/ml	Näyte 6	Näyte 6		
G	Matala kontrolli	Matala kontrolli	Näyte 7	Näyte 7		
H	Korkea kontrolli	Korkea kontrolli	Näyte 8	Näyte 8		

Suositeltava ELISA-levyn pipetointimalli kalibraattoreille, kontrolleille ja näytteille manuaalisessa testivaihtoehdossa. Kahden rinnakkaisen kuopan käyttöä yhdelle näytteelle suositellaan tuloksien luotettavuuden parantamiseksi. Täyteen levyyn mahtuu 40 näytettä.

9. TESTIMENETELMÄ

Seuraavat toimenpiteet koskevat manuaalista testausta. Hyväksytyt toimenpiteet Dynex DS2- ja DSX ELISA-automaattien käyttöön ovat saatavilla pyynnöstä. Huomioi, että kalibraattorin, 0-näyteliuoksen ja positiivisen kontrollin sekä konjugaatin putki sopivat DS2- ja DSX ELISA-automaatteihin. Muitakin automaattisia ELISA-välineitä voidaan myös käyttää, mutta asiakkaan tulee validoida ne.

9.1 Menetelmiä koskevia huomioita

- Valmistelu: Lue testiohje huolellisesti ennen määrityksen tekemistä. Tulosten luotettavuus on riippuvainen kuvatun testiohjeen huolellisesta noudattamisesta. Ennen testauksen aloittamista, pipetointimalli 0-näyteliuoksineen, kalibraattoreineen, kontrolleineen ja näytteineen tulee varmistaa huolellisesti, käyttäen esimerkiksi pakkauksessa olevaa pohjaa apuna. Valitse tarvittava määrä kuoppalevyn liuskoja. Käyttämättömät liuskat tulee sulkea alumiinipussiin ja säilyttää kohdassa 6.1. kuvatulla tavalla.

- Suositeltava laimennos ulostenäytteestä on 1:100. Tällä laimennoksella näytteen tulos on välillä 25 mg/kg (LoQ) – 2500 mg/kg ulosteesta. Näytteitä, joiden kalprotektiiniarvot ovat korkeat, voidaan laimentaa enemmän (> 1:100) ja testata uudelleen, jos tarkka arvo tarvitaan. Näytteitä, joiden kalprotektiiniarvot ovat alhaiset, voidaan laimentaa vähemmän (1:50). Käytetty laimennuskerroin tulee huomioida konvertoitaessa määriä yksiköstä ng/ml yksikköön mg/kg (katso kohta 10 jäljempänä).
- Tee kaikki testin vaiheet annetussa järjestyksessä ilman huomattavia viivästyksiä vaiheiden välillä.
- Jokainen kalibraattori, kontrolli ja näyte tulee annostella puhtaalla, kertakäyttöisellä pipettikärjellä.
- Jotta tulokset olisivat luotettavia, 0-näyteliuoksista, kalibraattoreista, kontrolleista ja potilasnäytteistä tulee aina testata myös kaksoiskappaleet.
- Kaikki näytteet ja pakkauksen reagenssit tulee saattaa huoneenlämpöön (18–25 °C) ennen testin aloittamista.

9.2 ELISA-menetelmä

1. Laimenna ulosteuutenäytteet suhteeseen 1:100 (esim. 10 µL näytettä + 990 µL näytteen laimennuspuskuria) ja sekoita hyvin Vortex-sekoittimessa.
2. Lisää 100 µL kutakin 0-näyteliuosta, kalibraattoria, kontrollia ja laimennettua näytettä kuoppalevyn kaksoiskappaleeseen. Katso suositeltu levyn järjestys kohdasta 8.
3. Peitä levy sulkijakalvolla ja inkuboi huoneenlämmössä 40 ± 5 min*) vaakatasoisessa levyn ravistimessa (nopeudella noin 500–700 r/min).
4. Poista neste inkubointiajan lopussa ja pese kuoppalevyn kuopat lisäämällä 300 µL pesupuskuria jokaiseen kuoppaan. Poista mahdollisimman suuri osa nesteestä ja toista pesu vielä kaksi kertaa. Jos käytössä on levynpesin, tarkista että kaikki imu- ja täyttöanturit ovat auki, jotta kuopat puhdistuvat kunnolla. Käännä viimeisen pesun jälkeen levy nurin ja taputtele kuoppia huolellisesti imukykyisellä pyyhkeellä poistaaksesi pesupuskurin jäämät.
5. Sekoita konjugaattipullon sisältö hellävaraisesti ennen käyttöä (älä ravista). Lisää 100 µL konjugaattiliuosta jokaiseen kuoppaan käyttämällä mielellään toistopipettiä tai monikanavaista pipettiä.
6. Peitä levy sinetöintikalvolla ja inkuboi huoneenlämmössä 40 ± 5 min*) vaakatasoisessa levyn ravistimessa (noin nopeudella 500–700 r/min).
7. Toista ylläkuvatut pesuvaiheet jokaiselle kuopalle kolme kertaa 300

µL:llä pesuainetta.
8. Lisää 100 µL substraattiliuosta jokaiseen kuoppaan, käytä mielellään toistopipettiä tai monikanavaista pipettiä.
9. Inkuboi huoneenlämmössä (älä ravista) valolta suojattuna 20–30 minuutin ajan.
10. Vaihtoehtoinen: Lisää 100 µL 1 M NaOH -pysäytysliuosta jokaiseen kuoppaan, jos ennalta määritetty inkubaatioaika on tarpeen.
11. Lue optisen tiheyden (OD) arvot 405 nm:n kohdalla ELISA-lukijan avulla. Jos levyn lukijassa on ravistelutoiminto, ravistele levyä hetken (2–3 sekuntia) ennen lukemista.

*) **Vaihtoehtoinen:** Lyhennetty inkubaatioaika (manuaalinen toimenpide). Inkubaatioaika voidaan lyhentää 30 ± 5 minuuttiin tulosten muuttumatta. OD:n arvot saattavat laskea, ja OD:n enimmäisarvo ylästandardille (500 ng/ml) voi olla alhaisempi kuin suositeltu 1,800, mutta tämä ei vaikuta tuloksiin.

10. TULOKSET

10.1 Kalibroidut kontrollien raja-arvot

- Uusi standardikäyrä pitää sisällyttää jokaiseen käyttökertaan.
- Positiiviset kontrollit pitää sisällyttää jokaiseen käyttökertaan. Kontrollien arvojen tulee olla lääkepullojen etiketteihin merkittyjen raja-arvojen mukaiset.
- Ohjeena on, että kalibraattori 5:n (500 ng/ml) OD-arvon tulee olla ≥1.6 ja 0-näyteliuoksen (0 ng/ml) OD-arvon tulee olla ≤0.25. Kuva 1 esittää edustavan kalibraattorikäyrän.

10.2 Tulosten laskenta

Kalprotektiinipitoisuuden laskeminen potilaan ulostenäytteestä:

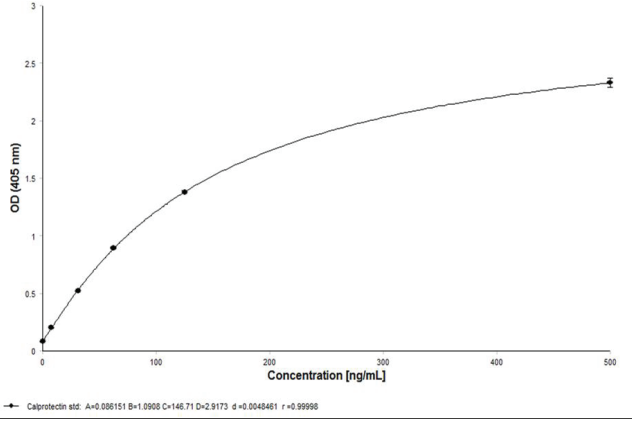
1. Laske kaikkien kaksoismääritysten (0-näyteliuos, kalibraattorit ja näytteet) keskimääräiset OD-arvot.
2. Merkitse 0-näyteliuoksen ja jokaisen kalibraattorin ja pitoisuuden (ng/ml) arvo X-akselille vastaamaan sen Y-akselilla olevaa OD-keskiarvoa piirtääksesi standardikäyrän. **Neliparametristä sovituskäyrää (curve fit function) suositellaan käytettäväksi** (katso kuva 1 alla). Jos logaritminen x-akseli on tarpeen, arvoa 0,001 ng/ml tulee käyttää 0-näyteliuokselle (0 ng/ml).
3. Määritä kalprotektiinipitoisuus laimennetuissa näytteissä (ng/ml) OD-arvojen perusteella käyttämällä kalibrointikäyrää.
4. **Kerro kalprotektiinipitoisuus (ng/ml) laimennetuissa ulostenäyt-**

teissä viidellä, jotta voit muuntaa ne yksikköön mg/kg kalprotektiinia alkuperäisessä ulostenäytteessä.

Tämä korjaa laimennoksen suhteessa 1:5000 (1:50 uuttamisvaiheessa ja sitä seuraava uutteen laimennus 1:100) ja muuttaa arvon yksiköistä ng/ml yksikköön mg/kg.

Esimerkki: jos laimennetun uutetun näytteen arvo on 100 ng/ml, alkuperäisen ulostenäytteen pitoisuus on 100 x 5 = 500 mg/kg.

Huomautus: Jos uutteita on laimennettu suositeltua suhdetta 1:100 enemmän (tai vähemmän), lisälaimennuskerroin tulee huomioida laskelmissa.



Kuva 1: Tyypillinen kalibraatiokäyrä, käytössä 4P käyrän sovitus.

10.3 Tulosten tulkinta

Kirjallisuudessa on raportoitu seuraavat kalprotektiinin arvot ulostenäytteissä[3, 25]:

Normaali arvo	5 – 50 mg/kg
Positiivinen arvo	> 50 mg/kg
Mediaaniarvo symptomaattista kolorektaalisyöpää sairastavilla potilailla	350 mg/kg
Aktiivinen, oireinen tulehduksellinen suolistosairaus	200 – 40 000 mg/kg

Huomaa, että diagnoosia ei tule tehdä yksittäisen testituloksen perusteella. Diagnoosissa tulee ottaa huomioon potilaan kliininen taudinkuva ja oireet.

Seuraavat kalprotektiinin arvot on todettu 100 terveen luovuttajan (50 miestä ja 50 naista) verestä:

Näytetyyppi:	**Keskiarvo (µg/L):**	**Keskihajonta:**
EDTA-plasma	627	307

11. TOIMENPITEEN RAJOITUKSET

Näytteen toistuva pakastaminen ja sulattaminen saattaa vaikuttaa testitulosten tarkkuuteen.
Lopullista diagnoosia ei tule tehdä yksittäisen testituloksen perusteella.

12. TESTIN SUORITUSARVOT

Huomautus. Kaikki testin varmennustutkimukset suoritettiin ulosteuutenäytteiden (laimennus 1:100) tai EDTA-plasmanäytteiden (laimennus 1:20) manuaalisella testauksella kohdassa 9 kuvatun ELISA-menetelmän mukaisesti.

Testien välinen ja testien sisäinen toistettavuus ulostenäytteistä ja testien sisäinen toistettavuus EDTA-plasmasta:

Testien välinen toistettavuus, ulostenäytteet*		Testien sisäinen toistettavuus, ulostenäytteet**		Testien sisäinen toistettavuus, EDTA-plasma***	
Pitoisuus ulosteessa (mg/kg)	**% CV**	**Pitoisuus ulosteessa (mg/kg)**	**% CV**	**Pitoisuus plasmassa (µg/l)**	**% CV**
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

* Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta, jokainen testasi kitin kaksi valmistuserää: kuusi näytettä testattiin yhteensä kymmenen kertaa viiden päivän aikana
** Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta, jokainen testasi kaksi valmistuserää: kuusi näytettä ja kymmenen toistoa yhdellä kerralla
*** Testattu käyttäen yhtä valmistuserää, kuusi näytettä laimennettiin suhteessa 1:20 ja testattiin kymmentä samanaikaista toistoa

Saanto (recovery)
Uloste: 85–105 %; testattu ulostenäytteellä, johon lisätty puhdistettua kalprotektiinia viidellä eri pitoisuudella.
Plasma: 81–105 %; testattu plasmalla, johon lisätty puhdistettua kalprotektiinia viidellä eri pitoisuudella.

Kvantifiointiraja (limit of quantification):
5 ng/ml; testattu ulostenäytteellä, plasmalla ja puhdistetulla kalprotektiinilla. Näytteet analysoitiin viisi kertaa viiden päivän aikana. Eri näytteiden ja määritysten CV:n keskiarvo tällä tasolla oli 12 %.

Määritysraja (limit of detection):
<5 ng/ml; laskettu keskiarvona (laimennuspuskuri; n= 32) + 5x SD.

Häiritsevät tekijät
Yeisesti käytettyjen lääkkeiden: prednisoloni, Imurel, salatsopyriini ja siprofloksasiini ei todettu vaikuttavan ELISA-testin tuloksiin.

Uuttamisen toistettavuus (precision)
Kaksi ulostenäytettä uutettiin molemmat kymmenen kertaa kohdassa 7.1.2 kuvailtujen toimenpiteiden mukaisesti ja uutteet analysoitiin ELISA-menetelmällä. Keskimääräiset tulokset kolmesta eri laboratoriosta ja yhdestä kitin valmistuserästä:

Näyte	Pitoisuus (mg/kg)	% CV
Low	130	8.7
High	1357	8.8

Lineaarisuus, ulostenäyteuutteet
Ulostenäyteuutteet (n = 10) laimennettiin suhteessa 1:100–1:1000 ja analysoitiin ELISA-menetelmällä. Keskimääräiset tulokset:

Laimennus	% laimennussuhteen 1:100 tuloksesta
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Näytteiden vaihtelu on huomioitu lineaarisuudessa.

Lineaarisuus, EDTA-plasma
Plasmanäytteet (n = 5) laimennettiin suhteessa 1:20–1:80 ja analysoitiin ELISA-menetelmällä. Keskimääräiset tulokset:

Laimennus	% laimennussuhteen 1:20 tuloksesta
1:20	100
1:40	107
1:80	116

Näytteiden vaihtelu on huomioitu lineaarisuudessa.

13. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET
• EU-direktiivin 98/79/EY 1. artiklan kohdan 2b mukaisesti, tämä *in vitro*

-diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite on valmistajan toimesta varmistettu käyttöön soveltuvaksi, toimivaksi ja turvalliseksi.

- Sen vuoksi käyttöohjeessa esitettyjä käyttöohjeita, tietoja, varatoimia ja varoituksia on seurattava tarkasti. Testikitin soveltuvuus käytettäväksi analysaattoreiden tai vastaavien laitteiden kanssa tulee validoida. Kaikki muutokset koskien muotoilua, kokopanoa ja testin suoritusohjetta sekä kaikki yhteiskäyttö muiden sellaisten tuotteiden kanssa, joita valmistaja ei ole hyväksynyt, ovat kiellettyjä ja käyttäjä on itse vastuussa muutoksista. Valmistaja ei ole vastuussa edellä mainituista syystä johtuvista virheellisistä tuloksista tai tapaturmista. Valmistaja ei ole vastuussa potilasnäytteiden visuaalisesta analysoinnista.
- Ainoastaan in vitro -diagnostiseen käyttöön
- Kaikki näiden reagenssien valmistuksessa käytetyt ihmisperäiset aineet on testattu HIV-vasta-aineiden, HCV-vasta-aineiden ja hepatiitti-B-antigeenien (Bag) suhteen ja ne on todettu negatiivisiksi. . Kuitenkin kaikkia materiaaleja on käsiteltävä potentiaalisesti tartuntavaarallisina.
- Älä vaihda reagensseja tai liuskoja tuote-erien välillä.
- Älä käytä tämän testin reagensseja yhdessä toisten valmistajien reagenssien kanssa.
- Älä käytä reagensseja niiden etikettiin merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen tai yhden kuukauden jälkeen siitä, kun konsentraateista on valmistettu käyttöliuos.
- Käytä vain puhtaita pipettikärkiä, annostelijoita ja laboratoriotarvikkeita.
- Estä ristikontaminaatio, äläkä vaihda reagenssipullojen korkkeja keskenään.
- Sulje reagenssien pullot tiukasti heti käytön jälkeen välttääksesi haihtumista ja mikrobikontaminaatiota.
- Tarkista ensimmäisen käytön ja sitä seuraavan säilytyksen jälkeen konjugaatin, kalibraattorien ja kontrollien pullot mikrobikontaminaation varalta ennen uudelleenkäyttöä.
- Vältääksesi ristikontaminaatio ja virheellisen korkeat testitulokset, pipetoi kalibraattorit, kontrollit ja ulosteuutenäytteet ja annostele konjugaatti ja substraatti tarkasti ja läikyttämättä kuoppalevyn kuopan pohjalle.
- Jotkin reagenssit sisältävät natriumatsidia alle 0,1 % (w/v) ja/tai 0,1 % Kathonia.
- Säilytä substraattiliuos alkuperäisessä, läpinäkymättömässä pullossa, liuoksen tulee olla kirkasta tai vaaleankeltaista. Sekoita varovasti ennen käyttöä.
- **BIOHIT kalprotektiini ELISA** -testi on tarkoitettu sellaisten pätevien

ammattilaisten käyttöön, jotka tuntevat hyvät laboratoriokäytännöt.

13.1 Huomioitava hävitettäessä

Kemikaalien ja liuosten jäämiä tulee yleisesti käsitellä ongelmajätteenä. Tämänkaltaisen jätteen hävittämisestä on säädetty kansallisissa ja alueellisissa laeissa ja säädöksissä. Ota yhteyttä paikallisiin viranomaisiin ja jätteenkäsittely-yhtiöihin, jotka neuvovat vaarallisen jätteen hävittämisessä.

14. TAKUU

Valmistaja lupaa korvata kaikki sen tuotteissa löydetyt viat (“Viallinen tuote”) jotka johtuvat epäsopivista materiaaleista tai huolimattomasta valmistustyöstä, mikä estää tuotteen mekaanisen toiminnan tai tarkoitetun käytön mukaanlukien, muttei rajoitettuna vain, toiminnat jotka on lueteltu valmistajan antamassa tuoteselostuksessa. TAKUU TULLAAN SILTI PITÄMÄÄN MITÄTÖITYNÄ JOS VIAN HUOMATAAN AIHEUTUNEEN TUOTTEEN VAHINGOITTAMISESTA, VÄÄRINKÄYTÖSTÄ, VÄÄRÄSTÄ SÄILYTYKSESTÄ, TAI KÄYTÖSTÄ ANNETTUJEN SPESIFIKAATIOIDEN TAI RAJOITUSTEN ULKOPUOLELLA. TAI KÄYTTÖOHJEEN VASTAISESTI. Takuun voimassaoloaika vastaa tuotteen säilyvyysaikaa. Tämä Biohitin diagnostinen kitti on valmistettu ISO 9001- / ISO 13485 -laaduntarkkailukäytännön mukaisesti. Säilyvyysaika on esitetty pakkausmerkinnöissä. Tulkinnasta johtuvien epäselvyyksien kyseenollessa englanninkielinen versio on voimassa.

15. TESTIN LYHYT KUVAUS

BIOHIT kalprotektiini ELISA -testi kalprotektiinin analysoimiseen ulosteesta
Katso tuoteselosteen kohdista 7-9 yksityiskohtaiset testin käyttöohjeet sekä plasma/seerumnäytteiden analysointiohjeet.

Näytteen uuttaminen
- Tee uuttaminen käyttäen yhtä kohdassa 7.1.1-7.1.2.kuvattua menetelmää

ELISA (manuaalinen menetelmä)
- Laimenna ulosteuutetta suhteessa 1:100 laimennuspuskuriin
- Lisää 100 µL kalibraatoreita, kontrollinäyteitä, 0-näyteliuosta ja näytteitä ELISA-levyylle
- Inkuboi levynravistimessa huoneenlämmössä 40 ± 5 minuutin* ajan
- Pese kuopat kolme kertaa 300 µl:lla pesupuskuria
- Lisää 100 µL konjugaattiliuosta jokaiseen kuoppaan
- Inkuboi levynravistimessa huoneenlämmössä 40 ± 5 minuutin* ajan
- Pese kuopat kolme kertaa 300 µL:lla pesupuskuria
- Lisää 100 µL substraattiliuosta jokaiseen kuoppaan
- Inkuboi peitettynä 20–30 minuutin ajan
- Vaihtoehtoinen: lisää 100 µL 1 M NaOH:a jokaiseen kuoppaan
- Lue OD-arvot 405 nm:n kohdalla ELISA-lukijan avulla
- Laske tulokset (ng/ml) käyttäen neliparametristä sovituskäyrää
- mg/kg ulosteessa = ng/ml × 5

*) voidaan lyhentää 30 ± 5 minuuttiin, jos analyysi tehdään manuaalisesti.

Jos sinulla on kysymyksiä, ota yhteyttä sähköpostiosoitteeseen: info@biohit.fi

SVENSKA

INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDANDE

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Kat. nr. 602 260

1. AVSEDD ANVÄNDNING 43
2. BAKGRUND 43
3. TESTETS PRINCIP 44
4. MATERIAL 45
4.1. Reagenser som ingår i kitet 45
4.2. Material som ingår i kitet 46
4.3. Material som krävs men ej medföljer 46
5. STABILITET OCH FÖRVARING 46
6. REAGENSBEREDNING 47
6.1. Bestrukna remsor för mikrotiterplatta 47
6.2. Provspädningsbuffert 47
6.3. Tvättbuffert 47
6.4. Fekalextraktionsbuffert 47
6.5. Kalibratorer, blank och kontroller 48
6.6. Konjugatlösning 48
6.7. Substratlösning 48
7. PROVTAGNING OCH BEREDNING 48
7.1. Fecesprover 48
7.1.1. Extraktion med BIOHIT extraktionsrör 49
7.1.2. Extraktion med vägningsmetoden (utan extraktionsenhet) 49
7.2. Plasma- och serumprover 50
8. FÖRSLAG TILL PLATTLAYOUT 50
9. TESTFÖRFARANDE 51
9.1 Förklaringar till förfarandet 51
9.2 ELISA-förfarande 51
10. RESULTAT 52
10.1 Kvalitetskontrollvärden 52
10.2 Resultatberäkning 52
10.3 Resultattolkning 54
11. FÖRFARANDETS BEGRÄNSNINGAR 54
12. KLINISKA PRESTANDA 54
13. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER 56
13.1 Kasseringshänseenden 58
14. GARANTI 58
15. FÖRFARANDET I KORTHET 59

1. AVSEDD ANVÄNDNING

BIOHIT Calprotectin ELISA är en kvantitativ metod för detektion av kalprotektin i avföringsprover. Den kan användas som hjälpmedel till att identifiera organisk sjukdom i tunntarmen, tjocktarmen eller magsäcken för att bestämma sjukdomsaktiviteten och följa behandlingsrespons hos patienter med ulcerös kolit eller Crohns sjukdom. **BIOHIT Calprotectin ELISA** har validerats för avföringsprover. T**estet är avsett för *in vitro*-diagnostiskt bruk.**

2. BAKGRUND

Kalprotektin är ett kalcium- och zinkbindande protein med en molekylärvikt på 36 kDa[1)] som frisätts speciellt från leukocyter i särskilda polymorfonukleära neutrofila granulocyter (PMN) till tarmlumen vid tunntarmsinflammation. Tarmens mikroorganismer stimulerar leukocyter till att migrera till tarmlumen där de frisätter sitt innehåll, inklusive antimikrobiella ämnen som kalprotektin. Detta protein utgör cirka 60 % av det totala proteinet i PMN:ernas cytoplasma [2)] och kan mätas tillförlitligt i fecesprover som har förvarats i upp till sju dagar i rumstemperatur [3)].

Olika sjukdomar, t.ex. bakteriella infektioner, reumatoid artrit och cancer, medför aktivering av PMN:er och förhöjda kalprotektinvärden i plasma, ryggmärgsvätska, ledvätska, tandköttsvätska, urin eller andra humanmaterial [4)].

Kalprotektinkoncentrationen i feces korrelerar med antalet PMN:er som migrerar till tarmlumen [5)], och kan påvisas tillförlitligt även i små (mindre än ett gram) slumpvisa avföringsprover [3,6)]. Organiska sjukdomar i tarmen ger en stark kalprotektinsignal, d.v.s. förhöjningen är ofta fem till flera tusen gånger högre än den övre referensnivån bland friska individer [3,7–9)], vilket indikerar tunntarmsinflammation. Inflammatoriska tarmsjukdomar (IBD), t.ex. ulcerös kolit och Crohns sjukdom, kan uppstå från tidig barndom till hög vuxen ålder och diagnosen fördröjs ofta av vaga symtom eller ovilja att utföra endoskopi och biopsi. BIOHIT Calprotectin ELISA kan bidra till tidigare diagnos av IBD eftersom testet vanligtvis är positivt vid aktiv IBD.

Funktionsstörningar som colon irritabile (IBS) orsakar inte förhöjda kalprotektinkoncentrationer, men det gör organiska åkommor i buken, som IBD. Patienter med organiska och funktionsstörningar i buken kan ha liknande symtom, och enbart klinisk undersökning kan därför vara otill-

räcklig för att ge en specifik diagnos. Ett test för fekalt kalprotektin är en enkel, icke-invasiv, billig och objektiv metod som kan vara till hjälp med att selektera patienter för vidare undersökning, t.ex. endoskopi. Buksymtom är mycket vanliga bland både barn och vuxna, och ett negativt resultat som uppmätts med BIOHIT Calprotectin ELISA kan med stor sannolikhet utesluta inflammatoriska tarmstörningar [7)].

Läkning av slemhinnan är det optimala målet för IBD-behandling, och ett test för fekalt kalprotektin visar när detta har uppnåtts. Många IBD-patienter i klinisk remission med normala värden för C-reaktivt protein (CRP) har fortfarande en pågående inflammation [10)], som påvisas av förhöjt fekalt kalprotektin. Sådana patienter löper ökad risk för återfall inom några månader [11)]. Om läkning av slemhinnan kan uppnås, minskar risken för återfall och behovet av omfattande bukkirurgi [12,13)]. En normalisering av kalprotektinvärdet innebär att läkning av slemhinnan har uppnåtts [14)]. Vår Calprotectin ELISA-teknik har också använts för analys av serum- och plasmaprover, och höga kalprotektinvärden har påträffats hos patienter med bakteriella infektioner [15,16)], sepsis och inflammatoriska tillstånd som reumatoid artrit (RA) och systemisk lupus erythematosus (SLE) [17–21)]. Vetenskapliga rapporter visar att kalprotektin i serum/plasma är en överlägsen markör för sjukdomsaktivitet vid RA och SLE och kan förutsäga anfall. Det är också en bra markör för akuta kranskärlshändelser som leder till myokardiell infarkt [22–24)].

3. TESTETS PRINCIP

BIOHIT Calprotectin ELISA bygger på beredning av ett fecesextrakt med fekalextraktionsbuffert. Kalprotektinvärdet bestäms genom att testa extraktet i en enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) som är specifik för kalprotektin.

I ELISA-analysen inkuberas prover och standarder i separata mikrotiterbrunnar som är bestrukna med monoklonala antikroppar som binder kalprotektin. Efter inkubering och tvättning av brunnarna kan bundet kalprotektin reagera med enzymmärkta, immunoaffinitetsrenade kalprotektinspecifika antikroppar. Efter denna reaktion är mängden bundet enzym i mikrotiterbrunnarna proportionell mot mängden kalprotektin i provet ellerkalibratoren, vilket bestäms genom inkubering med ett substrat för enzymet som ger en färgad produkt. Färgens intensitet bestäms genom absorbans med hjälp av en ELISA-plattläsare och är proportionell mot kalprotektinkoncentrationen i kalibratorerna och proverna. Analysen kali-

breras med kalprotektin som renats från leukocytextrakt.

4. MATERIAL

4.1. Reagenser som ingår i kitet

Bestruken mikrotiterplatta: 12 remsor, 8 brunnar per remsa, bestrukna med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar som är specifika för kalprotektin. Plattan förvaras i en försluten påse med torkmedel.

DILBUF 5x **Provspädningsbuffert (5x konc.) *****: 1 x 20 ml, 5x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, pH 8 ± 0,2, gulfärgad lösning, flaska med blått lock.

WASH 20x **Tvättbuffert (20x konc.) ***: 1 x 50 ml, 20x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, för tvättning av mikrotiterbrunnarna, pH 7,8 ± 0,2, ofärgad lösning, flaska med vitt lock.

FEC EXTRBUF 2.5X **Fekalextraktionsbuffert (2,5x konc.) ****: 2 x 90 ml, 2,5x koncentrat, för spädning med destillerat/avjoniserat vatten, pH 8 ± 0,2, ofärgad lösning, flaskor med vita lock.

CAL 1-5 **Kalprotektinkalibratorer och** **BLANK** *******: 6 flaskor med 1 ml gulfärgad lösning som är färdig att använda, flaskor med lock i olika färger:

Blank: Blått lock	0	ng/ml
Kalibrator 1: Grönt lock	7,8	ng/ml
Kalibrator 2: Gult lock	31,3	ng/ml
Kalibrator 3: Rött lock	62,5	ng/ml
Kalibrator 4: Vitt lock	125	ng/ml
Kalibrator 5: Svart lock	500	ng/ml

CONTROL LOW **CONTROL HIGH** **Kontroller ”Låg” och ”Hög” *****: 2 flaskor med 1 ml gulfärgad lösning som är färdig att använda, Ktr Låg: flaska med brunt lock. Ktr Hög: flaska med lila lock.

CONJ **Konjugatlösning ******: 113 ml alkaliska fosfatasmärkta, immunoaffinitetsrenade polyklonala kaninantikroppar mot kalprotektin, rödfärgad lösning som är färdig att använda, 25 ml Dynex-reagensrör med vitt lock.

SUBS **Substratlösning (pNPP)**: 13 ml ofärgad till svagt gulfärgad lösn-

ing som är färdig att använda, ogenomskinlig flaska med gult lock. Flaskan innehåller stabiliserande pellets.
Obs! Om ett Dynex-instrument används måste substratet överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

*	Innehåller 0,1 % kathon
**	Innehåller <0,1 % natriumazid
***	Innehåller 0,1 % kathon och <0,1 % natriumazid
****	Innehåller 0,02 % metylisotiazolon och 0,02 % bromnitrodioxan

4.2. Material som ingår i kitet
- 2 bitar förslutningsfolie
- 1 testprotokoll
- 1 plattlayout

4.3. Material som krävs men ej medföljer
- Destillerat/avjoniserat vatten
- Extraktionsinstrument (se avsnitt 7.1.1 och 7.1.2)
- Brytbara ympöglor för engångsbruk (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Känslig digitalvåg (40 – 150 mg) (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Polystyrenrör med skruvlock för engångsbruk, 5 ml (om vägningsmetoden i avsnitt 7.1.2 används)
- Vortexblandare
- Engångsrör för spädning av prover: Eppendorf-rör eller liknande (om analysen utförs manuellt)
- Pipetter för överföring av volymer mellan 10 – 1 000 µl (om analysen utförs manuellt)
- Repeterpipett eller flerkanalspipett, 100 µl (om analysen utförs manuellt)
- Tvättinstrument för mikroplattans brunnar eller flerkanalspipett, 300 µl (om analysen utförs manuellt)
- Plattskak (500 – 700 r/min) (om analysen utförs manuellt)
- Timer (om analysen utförs manuellt)
- Mikroplattläsare, filter 405 nm (om analysen utförs manuellt)
- 1M NaOH (stopplösning; valfritt)

5. STABILITET OCH FÖRVARING
Vid förvaring i oöppnat skick vid 2 – 8 °C är kitets reagenser stabila fram till det utgångsdatum som anges på etiketten.

Öppnade plattor, reagenser och koncentrerade buffertar är stabila i upp till tre månader vid förvaring vid 2 – 8 °C.

Arbetslösningar (1x) med tvättbuffert, provspädningsbuffert och fekalextraktionsbuffert som bereds i rena kärl kan förvaras i upp till en månad vid 2 – 8 °C.
Undvik exponering för hög temperatur och direkt solljus.

6. REAGENSBEREDNING
Låt alla reagenser, prover och kontroller anta rumstemperatur (18 – 25 °C) innan testet körs.

6.1. Bestrukna remsor för mikrotiterplatta
Plattremsorna som är färdiga att använda är bestrukna med affinitetsrenade monoklonala musantikroppar som är specifika för kalprotektin. Oanvända remsor ska tas bort från ramen och genast återförslutas i foliepåsen tillsammans med det medföljande torkmedlet. Förvara vid 2 – 8 °C.

6.2. Provspädningsbuffert
Späd den 5x-koncentrerade provspädningsbufferten genom att tillsätta 1 del (20 ml) till 4 delar (80 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 100 ml. Blanda väl. Förvara den spädda provspädningsbufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.
Obs! Om Dynex DS2 eller DSX ELISA-automat används måste provspädningsbufferten överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs.

6.3. Tvättbuffert
Späd den 20x-koncentrerade tvättbufferten genom att tillsätta 1 del (50 ml) till 19 delar (950 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 1 000 ml. Blanda väl. Förvara den spädda tvättbufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.

6.4. Fekalextraktionsbuffert
Späd den 2,5x-koncentrerade fekalextraktionsbufferten genom att tillsätta 1 del (90 ml) till 1,5 delar (135 ml) destillerat/avjoniserat vatten i ett rent kärl till en slutlig volym på 225 ml. Blanda väl. Förvara den spädda bufferten i ett slutet kärl vid 2 – 8 °C.

6.5. Kalibratorer, blank och kontroller
Flaskorna som är märkta med blank eller kalibrator samt kontrollerna innehåller 1 ml lösning vardera som är färdig att använda. Kalprotektinkoncentrationen är tryckt på etiketten på varje flaska. Flaskorna passar direkt i Dynex DS2 och DSX ELISA-automater.

6.6. Konjugatlösning
Röret innehåller 13 m alkaliska fosfatas-märkta (ALP), immunoaffinitetsrenade polyklonala kaninantikroppar mot kalprotektin i en buffert med stabiliserare, konserveringsmedel och ett inert rött färgämne. Lösningen är färdig att använda. Röret passar direkt i Dynex DS2 och DSX ELISA-automater.

6.7. Substratlösning
Flaskan innehåller 13 ml p-nitrofenylfosfatlösning (pNPP). Lösningen är färdig att använda och måste förvaras i den ogenomskinliga originalflaskan.

Obs! Om Dynex DS2 eller DSX ELISA-automat används måste enzymsubstratlösningen överföras till ett 25 ml Dynex-reagensrör innan testet körs. Undvik att överföra den stabiliserande pelletsen.

7. PROVTAGNING OCH BEREDNING
BIOHIT Calprotectin ELISA har utvecklats och validerats främst för fecesprover, men kan också användas med plasma- eller serumprover.

7.1. Fecesprover
Eftersom kalprotektin är mycket stabilt i avföring kan patienten ta små fecesprover i hemmet. Ta 1 – 5 g (cirka en tesked), placera provet i en lämplig, ren behållare och leverera det till laboratoriet snarast möjligt, dock senast inom 4 dagar. Om provet läggs i en behållare som är godkänd för transport kan det skickas med vanlig post; kylförvaring är inte nödvändig. Undvik exponering för temperaturer över 30 °C.

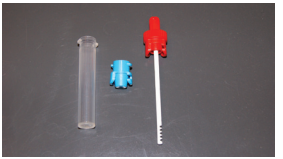
Prover kan också frysförvaras vid -20 °C eller lägre tills de levereras eller postas. Frysta prover måste tinas och ekvilibreras till rumstemperatur innan de extraheras och testas. Observera att frysning av fecesprover i vissa fall kan medföra förhöjda kalprotektinvärden, sannolikt på grund av frisättning från granulocyter.

Obs! Innan extraktionen påbörjas ska avföringsprovet blandas väl med t.ex. en spatel innan en mindre mängd tas ut för extraktion.

För extraktionen rekommenderar vi BIOHIT extraktionsrör eller den andra metod som beskrivs nedan (avsnitt 7.1.1 och 7.1.2). Utför extraktionen enligt bipacksedeln som medföljer den valda extraktionsenheten/-metoden. Andra metoder och enheter som validerats av kunden kan användas.

7.1.1. Extraktion med BIOHIT extraktionsrör

Bruksanvisning: se bipacksedeln för produktref. 602 270.



7.1.2. Extraktion med vägningsmetoden (utan extraktionsenhet)

1. Väg (tara) ett tomt skruvlocksrör med en ympögla.
2. Ta ut cirka 100 mg (mellan 40 och 120 mg) feces med ympöglan och placera det i skruvlocksröret. Undvik att ta med fast, ospjälkat material som fibrer och frön.
3. Väg röret och öglan med feces för att beräkna nettovikten för feces.
4. Bryt eller skär av den övre halvan av ympöglans skaft och lämna den nedre halvan inuti röret.
5. Tillsätt extraktionsbuffert till förhållandet vikt: volym 1:50, t.ex. 4,9 ml buffert till 100 mg feces. Sätt på korken på röret.
6. Blanda kraftigt i 30 sekunder med en vortexblandare.
7. Fortsätt att blanda på en skak (cirka 1 000 r/min) i 30 ±5 minuter med öglan inuti röret som agitator.
8. Låt röret stå ett par minuter på bänken så att partiklarna sjunker och pipettera sedan försiktigt från rörets öppning. Centrifugering är inte nödvändig, men en kort centrifugering kan utföras om en partikelfri lösning behövs.
9. Extraktet, som utgör en 1:50-spädning (vikt:volym) av avföringsprovet, är nu klart för spädning och testning.
10. Om provet ska förvaras ska cirka 0,5 ml överföras till ett nytt rör. Extrakt kan förvaras vid 2 – 8 °C i minst 5 dagar eller nedfryst under -20

°C i upp till 2 år.

7.2. Plasma- och serumprover
För sanna nivåer av kalprotektin i serum eller plasma krävs att proteinet inte frisätts från neutrofila granulocyter i blodet in vitro. För plasma är EDTA den lämpligaste antikoagulantian.

Rekommenderat provberedningsförfarande:
1. Ta ett blodprov med en vacutainer.
2. Centrifugera blodet med 3 000 r/min i 10 minuter snarast möjligt men dock senast inom 3 timmar efter provtagningen.
3. Samla in endast de övre två tredjedelarna av serum- eller plasmalagret genom försiktig pipettering så att leucocyterna i buffy coat-lagret inte aspireras.

Om ELISA används ska plasma eller serum spädas 1:20 (t.ex. 50 µl prov + 950 µl provspädningsbuffert). Följ sedan analysförfarandet enligt anvisningarna i avsnitt 9.

8. FÖRSLAG TILL PLATTLAYOUT

	1	2	3	4	etc.	
A	Kalibrator 5 500 ng/ml	Kalibrator 500 ng/ml	Prov 1	Prov 1		
B	Kalibrator 4 125 ng/ml	Kalibrator 4 125 ng/ml	Prov 2	Prov 2		
C	Kalibrator 3 62,5 ng/ml	Kalibrator 3 62,5 ng/ml	Prov 3	Prov 3		
D	Kalibrator 2 31,3 ng/ml	Kalibrator 2 31,3 ng/ml	Prov 4	Prov 4		
E	Kalibrator 1 7,8 ng/ml	Kalibrator 1 7,8 ng/ml	Prov 5	Prov 5		
F	Blank 0 ng/ml	Blank 0 ng/ml	Prov 6	Prov 6		
G	Kontroll ”Låg”	Kontroll ”Låg”	Prov 7	Prov 7		
H	Kontroll ”Hög”	Kontroll ”Hög”	Prov 8	Prov 8		

Förslag till layout för ELISA-platta med kalibratorer, kontroller och prover för manuellt förfarande. Duplicera brunnarna enligt rekommendationerna för att öka resultatens tillförlitlighet. En full platta rymmer 40 prover.

9. TESTFÖRFARANDE

Följande förfarande gäller manuell testning. Validerade protokoll för Dynex DS2 och DSX ELISA-automater är tillgängliga på begäran. Observera att flaskorna med kalibrator, blank och positiv kontroll samt konjugatröret passar direkt i DS2 eller DSX ELISA-automater. Andra automatiska ELISA-instrument kan också användas, men de måste valideras av kunden.

9.1 Förklaringar till förfarandet

- Beredning: Läs testprotokollet noga innan analysen utförs. Resultatets tillförlitlighet beror av att testprotokollet följs exakt enligt anvisningarna. Innan analysen påbörjas ska en plattlayout för alla blanka, kalibratorer, kontroller och prover fastställas, t.ex. med det blad som ingår i kitet. Välj nödvändigt antal mikrotiterremsor. Oanvända remsor ska återförslutas i foliepåsen och förvaras enligt anvisningarna i avsnitt 6.1.
- En 1:100-spädning av fecesextrakt rekommenderas. Denna spädning ger provresultat på mellan 25 mg/kg (LoQ) och 2 500 mg/kg i feces. Extrakt med högre kalprotektinvärde kan spädas mer (> 1:100) och omtestas om ett värde krävs. Extrakt med låga kalprotektinvärden kan spädas mindre (1:50). Den justerade spädningsfaktorn måste beaktas vid omvandling från ng/ml till mg/kg (se avsnitt 10 nedan).
- Utför alla steg i analysen i den ordning de anges och utan väsentliga dröjsmål mellan stegen.
- Använd en ren pipettspets till dispensering av vardera standard, kontroll och prov.
- För att få de mest tillförlitliga resultaten ska blanka, kalibratorer, kontroller och patientprover alltid köras i duplikat.
- Ekvilibrera alla prover och reagenser i kitet till rumstemperatur (18 – 25 °C) innan testet påbörjas.

9.2 ELISA-förfarande

1. Späd fecesextraktprover 1:100 (t.ex. 10 µl prov + 990 µl provspädningsbuffert) och vortexblanda väl.
2. Tillsätt 100 µl vardera av blank, kalibrator, kontroll och spätt prov i duplicerade brunnar; se rekommenderad plattlayout i avsnitt 8.
3. Täck plattan med förslutningsfolie och inkubera i rumstemperatur i 40 ±5 min*) på en horisontal plattskak (cirka 500 – 700 r/min).
4. Avlägsna vätskan mot slutet av inkuberingstiden och tvätta brunnarna genom att tillsätta 300 µl tvättbuffert i varje brunn. Avlägsna så mycket vätska som möjligt och upprepa tills sammanlagt tre tvättar har

utförts. Om en plattvätt används, kontrollera att aspirations- och påfyllningsslangarna inte är tilltäppta för att säkerställa effektiv tvätt av alla brunnar. Vänd efter sista tvätten plattan upp och ned och knacka brunnsöppningarna ordentligt mot ett absorberande papper för att avlägsna eventuell kvarvarande buffert.
5. Blanda varsamt innehållet i konjugatflaskan innan det används (skaka inte). Tillsätt 100 µl konjugat i varje brunn, helst med en repeter- eller flerkanalspipett.
6. Täck plattan med förslutningsfolie och inkubera i rumstemperatur i 40 ±5 min*) på en horisontal plattskak (cirka 500 – 700 r/min).
7. Upprepa tvättstegen enligt anvisningarna ovan tre gånger med 300 µl tvättlösning per brunn.
8. Tillsätt 100 µl substratlösning i varje brunn, helst med en repeter- eller flerkanalspipett.
9. Inkubera plattan i rumstemperatur (utan att skaka den) i 20 – 30 minuter skyddat från solljus.
10. Valfritt: Tillsätt 100 µl 1M NaOH stopplösning i varje brunn om en bestämd inkuberingstid krävs.
11. Läs av värdena för optisk densitet (OD) vid 405 nm med en ELISA-läsare. Om plattläsaren har funktionen för det, kan plattan skakas kort (2-3 sekunder) före avläsning.

*) **Valfritt**: Förkortad inkuberingstid (manuellt förfarande). Inkuberingstiden kan förkortas till 30 ±5 min utan att resultaten påverkas. En minskning i OD-värden kan observeras, och det högsta OD-värdet för toppstandarden (500 ng/m) kan sjunka under det rekommenderade 1 800, men detta påverkar inte resultaten.

10. RESULTAT

10.1 Kvalitetskontrollvärden
- En ny standardkurva måste inkluderas i varje körning.
- Positiva kontroller bör inkluderas i varje körning. Kontrollernas värden ska ligga inom de gränser som är tryckta på flasketiketterna.
- Som riktlinje bör OD-värdet för Kalibrator 5 (500 ng/ml) vara ≥ 1,6 och OD-värdet för Blank (0 ng/ml) bör vara ≤ 0,25. En representativ kalibratorkurva visas nedan i bild 1.

10.2 Resultatberäkning
Beräkning av kalprotektinkoncentrationen i fecesprover från patient:

1. Beräkna OD-medelvärdet för alla duplikatbrunnar (blanka, kalibratorer

och prover).

2. Plotta värdet för blank och varje kalibrator och koncentration (ng/ml) på x-axeln mot dess OD-medelvärde på y-axeln för att få en standardkurva. **En kurvanpassningsfunktion med fyra parametrar rekommenderas** (se bild 1 nedan). Om en logaritmisk x-axel krävs måste ett värde på 0,001 ng/ml användas för standard A (0 ng/ml).
3. Bestäm med hjälp av kalibreringskurvan kalprotektinkoncentrationen i de spädda proverna (ng/ml) baserat på deras OD-värden.
4. **Multiplicera kalprotektinkoncentrationen (ng/ml) i de spädda fecesextrakten med 5 för att omvandla till mg/kg kalprotektin i det ursprungliga avföringsprovet.**

Denna faktor korrigerar för den totala spädningen på 1:5000 (1:50 under extraktionen och den påföljande 1:100-spädningen av extrakten) och omvandlar värdet från ng/ml till mg/kg.

Exempel: Om ett spätt extraktprov har ett värde på 100 ng/ml var koncentrationen i det ursprungliga avföringsprovet 100 x 5 = 500 mg/kg.

Obs! Om extrakt har spätts mer (eller mindre) än det rekommenderade 1:100 måste den ytterligare spädningsfaktorn tas med i beräkningen.

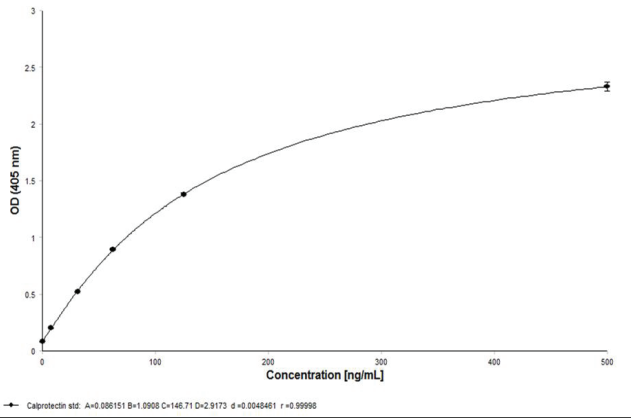


Bild 1: En representativ kalibratorkurva med 4-parameters kurvanpassning.

10.3 Resultattolkning

Följande kalprotektinvärden har rapporterats i publicerad litteratur [3, 25]:

Normalvärde	5 – 50 mg/kg
Positivt värde	> 50 mg/kg
Medelvärde hos patienter med symtomatiska kolorektala cancerformer	350 mg/kg
Aktiv, symtomatisk inflammatorisk tarmsjukdom	200 – 40 000 mg/kg

Observera att diagnos inte ska ställas baserat på ett enskilt testresultat. I diagnosen måste även klinisk anamnes och symtom beaktas.

Följande kalprotektinvärden påträffades i blod från 100 friska blodgivare (50 män och 50 kvinnor):

Provtyp:	**Medel (µg/l):**	**SD:**
EDTA-plasma	627	307

11. FÖRFARANDETS BEGRÄNSNINGAR

Diagnos ska inte ställas baserat på ett enskilt testresultat.

12. KLINISKA PRESTANDA

Obs! Alla utformningsverifierande studier utfördes genom manuella test på prover av fecesextrakt (spädda 1:100) eller EDTA-plasmaprover (spädda 1:20) med det ELISA-förfarande som beskrivs i avsnitt 9.

Precision i interanalys och intraanalys från fecesextrakt och i intraanalys från EDTA-plasma:

Interanalysprecision, fecesextrakt*		Intraanalysprecision, fecesextrakt**		Intraanalysprecision, EDTA-plasma***	
Koncentration i feces (mg/kg)	% CV	Koncentration i feces (mg/kg)	% CV	Koncentration i plasma (µg/l)	% CV
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

*Medelresultat från tre olika laboratorier som vardera testade två olika kitpartier: 6 prover testades sammanlagt 10 gånger under 5 dagar
** Medelresultat från tre olika laboratorier som vardera testade två olika kitpartier: 6 prover testades med 10 replikat i en körning
*** Testat med ett kitparti; 6 prover späddes 1:20 och testades med 10 replikat i en körning

Påvisning:
Feces: 85 – 105 %; testat med fekalextrakt spetsat med renat kalprotektin på fem olika nivåer.
Plasma: 81 – 105 %; testat med plasma spetsad med renat kalprotektin på fem olika nivåer.

Kvantifieringsgräns:
5 ng/ml; testad med fecesextrakt, plasma och renat kalprotektin. Proverna analyserades fem gånger under fem dagar. CV-medelvärdet för de olika proverna och bestämningarna på den här nivån var 12 %.

Detektionsgräns:
< 5 ng/ml, beräknad som medelvärde (provspädningsbuffert; n= 32) + 5x SD.

Interferens
Ingen observerad interferens på ELISA från vanligt förekommande läkemedel: Prednisolon, Imurel, Salazopyrin och Ciprofloxacin.

Extraktionsprecision:
Två fecesprover extraherades tio gånger vardera enligt det förfarande som beskrivs i avsnitt 7.1.2, och extrakten analyserades i ELISA. Medelresultat från tre olika laboratorier och ett kitparti:

Prov	Koncentration (mg/kg)	% CV
Låg	130	8.7
Hög	1357	8.8

Linearitet, fekalextrakt
Fekalextrakt (n=10) späddes 1:100 – 1:1000 och analyserades i ELISA. Medelresultat:

Spädning	% av 1:100-spädning
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Observera att provvariationen i linearitet har beaktats.

Linearitet, EDTA-plasma
Plasmaprover (n=5) späddes 1:20 – 1:80 och analyserades i ELISA. Medelresultat:

Spädning	% av 1:20-spädning
1:20	100
1:40	107
1:80	116

13. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- I enlighet med artikel 1 stycke 2b i Europaparlamentets och Rådets direktiv 98/79/EG, är användningen av medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik av tillverkaren avsedd att säkerställa produktens lämp-

lighet, prestanda och säkerhet. Testförfarandet, informationen samt de varningar och försiktighetsåtgärder som anges i bruksanvisningen måste därför följas noga. Användning av testkit med analyserare och liknande utrustning måste valideras. Ändring av utformning, sammansättning och testförfarande samt användning i kombination med andra produkter som inte godkänts av tillverkaren tillåts inte; användaren ansvarar själv för sådana ändringar. Tillverkaren ansvarar inte för falska resultat och incidenter av denna anledning. Tillverkaren ansvarar inte för eventuella resultat från visuell analys av patientproverna.

- Endast för *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- Alla komponenter av mänskligt ursprung som använts i tillverkningen av dessa reagenser har testats för anti-HIV-antikroppar, anti-HCV-antikroppar och hepatit B-antigen (Bag) och har visats vara icke-reaktiva. Allt material ska dock betraktas och hanteras som potentiellt smittförande.
- Blanda inte reagenser och remsor från olika tillverkningspartier.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagenser i det här testkitet.
- Använd inte reagenser efter det utgångsdatum som anges på etiketten eller senare än en månad efter beredning av koncentrerade reagenser till arbetslösningar.
- Använd endast rena pipettspetsar, dispenserare och labbutrustning.
- Förebygg korskontaminering genom att inte blanda ihop skruvlocken till reagensflaskorna.
- Dra åt flasklocken ordentligt direkt efter användning för att undvika avdunstning och mikrobkontaminering.
- Efter att ha öppnats och sedan förvarats ska konjugat-, kalibrator- och kontrollflaskor kontrolleras för mikrobkontaminering innan de används.
- Undvik korskontaminering och falskt förhöjda resultat genom att pipettera standarder, kalibratorer och fekalextraktprover och dispensera konjugat och substrat korrekt till botten i mikroplattans brunnar utan stänk.
- Vissa reagenser innehåller natriumazid med en halt under 0,1 % (v/v) och/eller 0,1 % kathon.
- Förvara substratlösningen i sin ogenomskinliga originalflaska; lösningen ska vara ofärgad till svagt gul. Blanda varsamt före användning.
- **BIOHIT Calprotectin ELISA** är avsedd för användning av utbildad personal med kunskaper i god laboratoriepraxis.

13.1 Kasseringshänseenden
Rester av kemikalier och beredningar betraktas allmänt som riskavfall. Kassering av sådant avfall regleras i nationella och lokala förordningar och bestämmelser. Kontakta lokala myndigheter eller avfallshanteringsföretag som kan ge råd om hur riskavfall ska kasseras.

14. GARANTI
Biohit ska avhjälpa alla defekter som påträffas i någon Produkt (den ”Defekta produkten”) som härrör frånolämpliga material eller försumligt utförande och som förhindrar Produkternas mekaniska funktion eller avsedda användning, inklusive men inte begränsat till de funktioner som anges i Biohits Produktspecifikationer.EVENTUELL GARANTI BETRAKTAS DOCK SOM OGILTIG OM FELET VISAR SIG HA UPPSTÅTT TILL FÖLJD AV FELAKTIG HANTERING ELLER ANVÄNDNING, SKADA TILL FÖLJD AV OLYCKSHÄNDELSE, FELAKTIG FÖRVARING ELLER ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA FÖR BRUK SOM LIGGER UTANFÖR DERAS ANGIVNA BEGRÄNSNINGAR ELLER SPECIFIKATIONER I STRID MOT DE ANVISNINGAR SOM LÄMNAS I INSTRUKTIONSMANUALEN. Garantiperioden framgår av Produkternas instruktionsmanual och börjar gälla från det datum då den relevanta Produkten skickas av Biohit. Detta diagnostiska kit från Biohit har tillverkats i enlighet med kvalitetsledningsprotokollen ISO 9001/ISO 13485. I fall av tolkningsdispyter är det den engelska texten som gäller.

15. FÖRFARANDET I KORTHET

BIOHIT Calprotectin ELISA-kit för analys av kalprotektin i feces
Se avsnitt 7 – 9 i bipacksedeln för en fullständig beskrivning av de praktiska stegen och om analys av plasma/serum.

Extraktion
Utför extraktionen enligt en av de metoder som beskrivs i avsnitt 7.1.1 – 7.1.2

ELISA (manuellt förfarande)
- Späd fekalextrakt 1:100 i provspädningsbuffert
- Tillsätt 100 µL kalibratorer, kontroller, blanka och prover till ELISA-plattan
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40 ±5 min*)
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µL tvättbuffert
- Tillsätt 100 µL konjugatlösning till varje brunn
- Inkubera på en plattskak i rumstemperatur i 40 ±5 min*)
- Tvätta brunnarna tre gånger med 300 µl tvättbuffert
- Tillsätt 100 µL substratlösning till varje brunn
- Inkubera övertäckt i 20 – 30 min
- Valfritt: tillsätt 100 µL 1M NaOH till varje brunn
- Läs av OD-värdena vid 405 nm med en ELISA-läsare
- Beräkna resultaten (ng/ml) med en 4-parameters kurvanpassning
- mg/kg i feces = ng/ml × 5

*) kan förkortas till 30 ±5 min om analysen körs manuellt.

Om du har frågor, kontakta info@biohit.fi

FRANÇAIS

MANUEL D'INSTRUCTION

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Cat. No. 602 260

1. APPLICATION 61
2. ANTÉCÉDENTS 61
3. PRINCIPE DU TEST 62
4. MATÉRIEL 63
4.1. Réactifs fournis avec le kit 63
4.2. Matériel fourni avec le kit 64
4.3. Matériel nécessaire non fourni 64
5. STABILITÉ ET STOCKAGE 65
6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS 65
6.1. Bandes de plaques microtitres coatées 66
6.2. Tampon de dilution d'échantillon 66
6.3. Tampon de lavage 66
6.4. Tampon d'extraction de selles 66
6.5. Calibrateurs, témoins et contrôles 66
6.6. Solution de conjugué 66
6.7. Solution substrat 67
7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS 67
7.1. Échantillons de selles 67
7.1.1. Extraction à l'aide de tubes BIOHIT 68
7.1.2. Extraction à l'aide de la méthode de pesée 68
7.2. Échantillons de plasma et sérum 69
8. PLAN DE PLAQUE SUGGÉRÉ 70
9. PROCÉDURE DE TEST 70
9.1 Remarques concernant la procédure à suivre 70
9.2 Procédure ELISA 71
10. RÉSULTATS 72
10.1 Valeurs de contrôle de qualité 72
10.2 Calcul des résultats 72
10.3 Interprétation des résultats 74
11. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE 74
12. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES 74
13. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS 77
13.1 Considérations relatives à l'élimination 78
14. GARANTIE 78
15. RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE À SUIVRE 79

1. APPLICATION

Le kit **BIOHIT Calprotectin ELISA** est une méthode quantitative pour la détection de calprotectine dans les échantillons de selles. Il peut être utilisé pour aider à identifier une maladie organique de l'intestin grêle, du gros intestin ou de l'estomac, déterminer l'activité de la maladie et surveiller la réponse au traitement chez des patients atteints de rectocolite hémorragique ou de maladie de Crohn. Le kit **BIOHIT Calprotectin ELISA** a été validé pour les échantillons de selles. **Le test est conçu pour son utilisation en diagnostic *in vitro***.

2. ANTÉCÉDENTS

La calprotectine est une protéine de liaison au calcium et au zinc de 36 kD[1)] notamment libérée par les leucocytes, et tout particulièrement les granulocytes neutrophiles (PNN), dans la lumière du tube digestif en cas d'inflammation de la muqueuse intestinale. Les micro-organismes de l'intestin stimulent la migration des leucocytes dans la lumière du tube digestif, où ils libèrent leurs contenus, y compris des substances antimicrobiennes comme la calprotectine. Cette protéine constitue environ 60 % de toutes les protéines présentes dans le cytoplasme des PNN [2)] et sa quantité peut être estimée de façon fiable dans des échantillons de selles stockés pendant un maximum de sept jours à température ambiante [3)].
Plusieurs types de maladie, comme les infections bactériennes, l'arthrite rhumatismale et le cancer, déclenchent l'activation des PNN et augmentent les niveaux de calprotectine dans le plasma, le liquide cérébrospinal, le liquide synovial, le liquide créviculaire et l'urine, entre autres matériels humains [4)].

La concentration de calprotectine dans les selles est corrélée au nombre de PNN qui migrent dans la lumière du tube digestif [5)], et peut être détectée de façon fiable, même dans des échantillons de faibles dimensions (moins d'un gramme) de selles prélevés de façon aléatoire [3,6)]. Les maladies organiques de l'intestin se traduisent par d'importantes quantités de calprotectine : les augmentations sont généralement de cinq à plusieurs milliers de fois supérieures à la valeur de référence des individus sains [3,7-9)], ce qui indique une inflammation intestinale. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn, peuvent apparaître dès la plus tendre enfance jusqu'à l'âge adulte le plus avancé. Leur diagnostic est souvent retardé en raison de symptômes vagues ou d'une réticence à pratiquer l'endoscopie et la biopsie. Le kit **BIOHIT Calprotectin ELISA** peut con-

tribuer à un diagnostic plus précoce des MICI dans la mesure où le test est généralement positif sur les MICI actives.

Des troubles fonctionnels comme le côlon irritable ne provoquent pas d'augmentation de la concentration de calprotectine dans les selles, mais des troubles abdominaux organiques semblables à ceux provoqués par les MICI. Les patients atteints de troubles abdominaux organiques et fonctionnels peuvent montrer des symptômes similaires, et un examen clinique peut ne pas être suffisant, à lui seul, pour établir un diagnostic spécifique. Le test de la calprotectine fécale est une méthode simple, non invasive, peu coûteuse et objective pouvant aider à sélectionner les patients sur lesquels pratiquer un examen supplémentaire, comme une endoscopie. Les symptômes abdominaux sont très fréquents chez les enfants et les adultes, et un résultat négatif mesuré par le kit **BIOHIT Calprotectin ELISA** permet d'écarter avec une forte probabilité le risque de troubles intestinaux inflammatoires [7)].

La cicatrisation de la muqueuse est l'objectif ultime de tout traitement contre les MICI, et le test de la calprotectine fécale permet de savoir quand celui-ci est atteint. Beaucoup de patients atteints de MICI en rémission clinique avec des niveaux de protéine C réactive (CRP) normaux souffrent toujours d'inflammation [10)], reflétée par une augmentation de la calprotectine fécale. Ces patients augmentent le risque de rechute au cours des prochains mois [11)]. Si la cicatrisation des muqueuses peut être atteinte, le risque de rechute et les besoins de chirurgie abdominale majeure diminueront [12,13)]. Une normalisation des niveaux de calprotectine signifie que la cicatrisation des muqueuses s'est produite [14)]. Notre technologie Calprotectin ELISA a également été utilisée pour l'analyse d'échantillons de sérum et plasma, et de hauts niveaux de calprotectine ont été détectés chez des patients souffrant d'infections bactériennes [15,16)], de sepsis et de conditions inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux systémique (LES) [17-21)]. Des publications scientifiques montrent que la calprotectine dans le sérum/plasma est un marqueur supérieur de l'activité de la maladie dans le cas de la PR et du LES, et peut permettre de prédire d'éventuelles intensifications. C'est aussi un bon marqueur d'événements artériels coronariens aigus conduisant à un infarctus du myocarde [22-24)].

3. PRINCIPE DU TEST

Le kit BIOHIT Calprotectin ELISA repose sur la préparation d'un échantil-

lon de selles à l'aide d'un tampon d'extraction de selles. Le niveau de calprotectine est déterminé est soumettant l'échantillon à un test immunoenzymatique (ELISA) spécifique de la calprotectine.

Dans l'ELISA, des échantillons et calibraterus sont incubés dans des puits de plaques microtitres séparés, coatés avec des anticorps monoclonaux qui fixent la calprotectine. Après incubation et lavage des puits, la calprotectine fixée peut réagir avec des anticorps spécifiques de la calprotectine purifiés par immuno-affinité, marqués avec une enzyme. Après cette réaction, la quantité d'enzyme fixée dans les puits de la plaque microtitre est proportionnelle à la quantité de calprotectine dans l'échantillon ou l'étalon. Elle est déterminée par incubation de l'enzyme avec un substrat pour donner un produit coloré. L'intensité de la couleur est déterminée par absorbance à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA et est proportionnelle à la concentration de calprotectine dans les calibrateurs et échantillons. L'essai est calibré par l'utilisation de calprotectine purifiée à partir d'un extrait leucocytaire.

4. MATÉRIEL

4.1. Réactifs fournis avec le kit

Plaque microtitre coatée : 12 bandes, 8 puits par bande, coatées avec des anticorps de souris monoclonaux purifiés par immuno-affinité, spécifiques de la calprotectine. La plaque est conservée dans un sachet étanche contenant un agent déshydratant.

DILBUF 5x **Tampon de dilution d'échantillon (5 x conc.) *****: 1 x 20 ml, concentré 5 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée ; pH 8,0 ± 0,2, solution de couleur jaune, bouteille à bouchon bleu.

WASH 20x **Tampon de lavage (20 x conc.) ***: 1 x 50 ml, concentré 20 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée, pour laver les puits des plaques microtitres ; pH 7,8 ± 0,2, solution transparente, bouteille à bouchon blanc.

FEC EXTRBUF 2.5X **Tampon d'extraction de selles (2,5 x conc.) ****: 2 x 90 ml, concentré 2,5 x, à diluer dans de l'eau distillée/désionisée ; pH 8,0 ± 0,2, solution transparente, bouteilles à bouchon blanc.

CAL 1-5 **Calibrateurs de calprotectine et** **BLANK** *******: 6 flacons de

1,0 ml, prêts à l'utilisation ; solution de couleur jaune, flacons avec des bouchons de couleurs différentes :

Blank : bouchon bleu	0	ng/ml
Calibrateur 1 : bouchon vert	7.8	ng/ml
Calibrateur 2 : bouchon jaune	31.3	ng/ml
Calibrateur 3 : bouchon rouge	62.5	ng/ml
Calibrateur 4 : bouchon blanc	125	ng/ml
Calibrateur 5 : bouchon noir	500	ng/ml

CONTROL LOW **CONTROL HIGH** **Contrôles « Faible » et « Fort » *****: 2 flacons de 1,0 ml, prêts à l'utilisation ; solution de couleur jaune ; Ctr. faible : flacon avec un bouchon marron ; Ctr. fort : flacon avec un bouchon mauve.

CONJ **Solution de conjugué ******: 113 ml anticorps de lapin polyclonaux purifiés par immuno-affinité, marqués avec une phosphatase alcaline contre la calprotectine, prêts à l'usage ; solution de couleur rouge, 25 ml tube de réactif Dynex à bouchon blanc.

SUBS **Solution substrat (pNPP)**: 113 ml, prêt à l'usage ; solution transparente à légèrement jaune, bouteille opaque à bouchon jaune. La bouteille contient des granulats de stabilisation.

Remarque : si l'on utilise un instrument Dynex, le substrat doit être transféré dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test.

*	Contient 0,1 % de Kathon
**	Contient < 0,1 % d'azoture de sodium
***	Contient 0,1 % de Kathon et < 0,1 % d'azoture de sodium
****	Contient 0,02 % de méthylisothiazolinone et 0,02 % de bromonitrodioxane

4.2. Matériel fourni avec le kit

- 2 feuilles de scellement
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de plaque

4.3. Matériel nécessaire non fourni

Eau distillée/désionisée

- Dispositifs d'extraction (voir points 7.1.1 et 7.1.2)
- Boucles d'inoculation jetables, cassables (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)

- Balance numérique de précision (40 – 150 mg) (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)
- Tubes à bouchon vissable en polystyrène jetables, 5 ml (si l'on utilise la méthode de pesée du point 7.1.2)
- Vortex
- Tubes jetables pour la dilution des échantillons : tubes Eppendorf ou similaires (si l'essai est réalisé manuellement)
- Pipettes permettant de distribuer des volumes 10 – 1 000 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Pipette à répétition ou multi-canaux, 100 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Pipette de lavage de puits de plaque microtitre ou multi-canaux, 300 µl (si l'essai est réalisé manuellement)
- Vibreur agitateur de plaques (500 – 700 tr/min) (si l'essai est réalisé manuellement)
- Minuterie (si l'essai est réalisé manuellement)
- Lecteur de plaques microtitres, filtre 405 nm (si l'essai est réalisé manuellement)
- 1M NaOH (solution d'arrêt ; option)

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Lorsqu'ils sont non ouverts et conservés à 2 – 8 °C, les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

Une fois ouverts, les plaques, réactifs et tampons concentrés sont stables pendant trois mois s'ils sont conservés à 2 – 8 °C.

Si elles sont préparées dans des récipients propres, les solutions de travail (1 x) de tampon de lavage, tampon de dilution d'échantillon et tampon d'extraction de selles peuvent être conservées à 2 – 8°C pendant un mois.

Éviter toute exposition aux hautes températures et à la lumière directe du soleil.

6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tous les réactifs, échantillons et contrôles doivent être portés à température ambiante (18 – 25 °C) avant de commencer la série de tests.

6.1. Bandes de plaques microtitres coatées
Les bandes de plaques prêtes à l'usage sont coatées avec des anticorps de souris monoclonaux purifiés par immuno-affinité, spécifiques de la calprotectine. Les bandes non utilisées doivent être retirées de la plaque et immédiatement replacées dans le sachet étanche en papier d'aluminium avec l'agent déshydratant fourni. Stocker à 2 – 8 °C.

6.2. Tampon de dilution d'échantillon
Diluer le tampon de dilution d'échantillon concentré 5 x en ajoutant 1 partie (20 ml) à 4 parties (80 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 100 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon de dilution d'échantillon dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C. Remarque : si l'on utilise un système automatisé Dynex DS2 ou DSX, le tampon de dilution d'échantillon doit être transféré dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test.

6.3. Tampon de lavage
Diluer le tampon de lavage concentré 20 x en ajoutant 1 partie (50 ml) à 19 parties (950 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 1 000 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon de lavage dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C.

6.4. Tampon d'extraction de selles
Diluer le tampon d'extraction de selles concentré 2,5 x en ajoutant 1 partie (90 ml) à 1,5 partie (135 ml) d'eau distillée/désionisée dans un récipient propre jusqu'à un volume final de 225 ml. Bien mélanger. Stocker le tampon dilué dans un récipient fermé à 2 – 8 °C.

6.5. Calibrateurs, témoins et contrôles
Les flacons étiquetés comme témoins, calibrateurs et contrôles contiennent chacun 1,0 ml de solution prête à l'usage. La concentration de calprotectine est imprimée sur l'étiquette de chaque flacon. Les flacons peuvent être placés directement dans les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX.

6.6. Solution de conjugué
Le tube contient 13 ml d'anticorps de lapin purifiés par immuno-affinité, marqués avec une phosphatase alcaline (ALP) contre la calprotectine dans un tampon avec des stabilisateurs, conservateurs et un colorant rouge inerte. La solution est prête à l'usage. Le tube peut être placé di-

rectement dans les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX.

6.7. Solution substrat
La bouteille contient 13 ml de solution de p-nitrophénylphosphate (pNPP). La solution est prête à l'usage et doit être conservée dans sa bouteille opaque originale.

Remarque : Si l'on utilise un automate ELISA Dynex DS2 ou DSX, la solution de substrat enzymatique doit être transférée dans un tube de réactif Dynex de 25 ml avant de réaliser le test. Éviter de transférer les granulats de stabilisation.

7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS
Le kit BIOHIT Calprotectin ELISA a été développé et validé principalement pour des échantillons de selles, mais il peut également être utilisé pour des échantillons de plasma/sérum.

7.1. Échantillons de selles
Dans la mesure où la calprotectine est très stable dans les selles, les patients peuvent prélever de petits échantillons de selles chez eux. Effectuer un prélèvement de 1 – 5 g (environ une petite cuiller), le placer dans un récipient propre et le remettre au laboratoire le plus tôt possible, dans un délai maximum de quatre jours. S'il est placé dans un récipient adéquat pour son transport, il peut être envoyé par courrier ordinaire (aucune réfrigération n'est nécessaire). L'exposition à des températures de plus de 30 ºC doit être évitée.

Les échantillons peuvent également être stockés congelés à -20 ºC ou moins, jusqu'à leur remise ou envoi. Les échantillons congelés doivent être décongelés et portés à température ambiante avant l'extraction et le test. Il faut savoir que dans certains cas, les échantillons de selles congelés peuvent avoir des niveaux de calprotectine supérieurs, probablement dus à sa libération par les granulocytes.

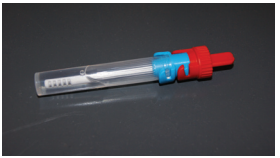
Remarque : Avant de commencer l'extraction, l'échantillon de selles doit être bien homogénéisé, en utilisant par exemple une spatule avant le prélèvement d'une faible quantité.

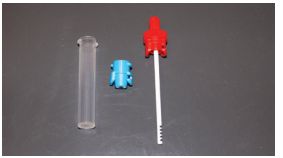
Pour l'extraction, nous recommandons l'utilisation de tubes d'extraction BIOHIT ou de toute autre des méthodes décrites ci-dessous (chapitre

7.1.1 et 7.1.2). Effectuer l'extraction conformément à la notice contenue dans l'emballage pour la méthode et le dispositif d'extraction choisis. D'autres méthodes et dispositifs, validés par le client, peuvent être utilisés.

7.1.1. Extraction à l'aide de tubes BIOHIT

Mode d'emploi : veuillez lire la notice contenue de l'emballage du produit réf. 602 270.





7.1.2. Extraction à l'aide de la méthode de pesée (sans dispositif d'extraction)

1. Peser (tarer) un tube à bouchon vissant vide avec une boucle d'inoculation.
2. Prélever env. 100 mg (entre 40 et 120 mg) de selles à l'aide de la boucle d'inoculation et l'introduire dans le tube à bouchon vissant. Éviter de prélever des matières solides non digérées telles que des fibres et des graines.
3. Peser le tube et la boucle avec les selles, pour obtenir le poids net de selles.
4. Casser ou couper la moitié supérieure du manche de la boucle et laisser la partie inférieure à l'intérieur du tube.
5. Ajouter le tampon d'extraction jusqu'à un rapport poids/ volume de 1/50 (par exemple, 4,9 ml de tampon pour 100 mg de selles). Fermer le tube.
6. Mélanger soigneusement pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex.
7. Continuer à mélanger avec un vibreur agitateur (à env. 1 000 tr/min) pendant 30 ± 5 minutes avec la boucle à l'intérieur du tube faisant office d'agitateur.
8. Laisser reposer pendant deux minutes sur la paillasse pour que les particules se déposent, et pipetter soigneusement la partie supérieure du tube. La centrifugation n'est pas nécessaire, mais elle peut être réalisée pendant un bref intervalle de temps si l'on souhaite une solution exempte de particules.

9. L'extrait, qui représente une dilution au 1/50e (poids/volume) de l'échantillon de selles, est désormais prêt à être dilué et testé.
10. Pour le stockage, transférer environ 0,5 ml dans un nouveau tube. Les extraits peuvent être stockés à 2 – 8 °C pendant au moins cinq jours ou congelés à moins de -20 °C pendant un maximum de deux ans .

7.2. Échantillons de plasma et sérum

Les véritables niveaux de calprotectine dans le sérum ou le plasma exigent que la protéine ne soit pas libérée par les granulocytes neutrophiles sanguins in vitro. Pour le plasma, l'EDTA est l'anticoagulant de prédilection.

Procédure de préparation recommandée pour les échantillons :

1. Prélever du sang à l'aide d'un Vacutainer.
2. Centrifuger le sang à 3 000 tr/minute pendant 10 minutes dès que possible (jamais plus de trois heures après le prélèvement).
3. Récupérer uniquement les deux tiers supérieurs de la couche de sérum ou plasma par un pipetage soigneux de façon à ce que les leucocytes de la couche leucocytaire ne soient pas aspirés.

Pour le test ELISA, diluer le plasma ou sérum au 1/20e (par ex. 50 µl échantillon + 950 µl tampon de dilution d'échantillon) et suivre le protocole d'essai décrit au point 9.

8. PLAN DE PLAQUE SUGGÉRÉ

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrateur 5 500 ng/ml	Calibrateur 5 500 ng/ml	Échantillon 1	Échantillon 1		
B	Calibrateur 4 125 ng/ml	Calibrateur.4 125 ng/ml	Échantillon 2	Échantillon 2		
C	Calibrateur 3 62,5 ng/ml	Calibrateur 3 62,5 ng/ml	Échantillon 3	Échantillon 3		
D	Calibrateur 2 31,3 ng/ml	Calibrateur 2 31,3 ng/ml	Échantillon 4	Échantillon 4		
E	Calibrateur 1 7,8 ng/ml	Calibrateur 1 7,8 ng/ml	Échantillon 5	Échantillon 5		
F	Témoin 0 ng/ml	Témoin 0 ng/ml	Échantillon 6	Échantillon 6		
G	Contrôle faible »	Contrôle faible »	Échantillon 7	Échantillon 7		
H	Contrôle fort »	Contrôle fort »	Échantillon 8	Échantillon 8		

Plan de plaque ELISA suggéré pour les calibrateurs, contrôles et échantillons en utilisant la procédure manuelle. Il est recommandé de dupliquer les puits pour accroître la fiabilité des résultats. Una plaque complète contient 40 échantillons.

9. PROCÉDURE DE TEST

La procédure suivante correspond à un essai manuel. Des protocoles validés pour les systèmes automatisés Dynex DS2 et DSX sont disponibles sur demande. Les flacons des calibrateurs, témoins et contrôles positifs, ainsi que le tube de conjugué, peuvent être directement placés dans les systèmes automatisés DS2 ou DSX. D'autres instruments automatisés ELISA peuvent être utilisés, mais ils doivent être validés par le client.

9.1 Remarques concernant la procédure à suivre

- Préparation : Lire soigneusement le protocole avant d'effectuer le test. La fiabilité du résultat dépend du strict respect du protocole de test tel qu'il est décrit. Avant de commencer le test, un plan de la plaque avec tous les témoins, calibrateurs, contrôles et échantillons doit être soigneusement dressé, en utilisant, par exemple, la feuille fournie dans le kit. Sélectionner le nombre nécessaire de bandes de plaques microtitres. Les bandes non utilisées doivent être replacées dans le sachet

étanche en aluminium et stockées conformément aux instructions du point 6.1.

- Il est recommandé de diluer les extraits de selles au 1/100e. Cette dilution fournira, pour les échantillons, des résultats compris entre 25 mg/kg (LoQ) et 2 500 mg/kg dans les selles. Les extraits contenant les plus hautes valeurs de calprotectine peuvent être dilués davantage (> 1/100e) et retestés si leur valeur l'exige. Les extraits ayant de faibles valeurs de calprotectine peuvent être moins dilués (1/50e). Le facteur de dilution ajusté doit être pris en compte lorsqu'on effectue la conversion de ng/ml à mg/kg (voir point 10 ci-dessous).
- Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre indiqué, sans délai appréciable entre les étapes.
- Un embout jetable propre de pipette doit être utilisé pour chaque étalon, contrôle et échantillon.
- Pour garantir les résultats les plus fiables, les témoins, calibrateurs, contrôles et échantillons du patient doivent toujours être analysés en double.
- Tous les échantillons et réactifs du kit doivent être portés à température ambiante (18 – 25 °C) avant de commencer le test.

9.2 Procédure ELISA

1. Diluer les échantillons d'extraits de selles au 1/100e (par ex. 10 µl échantillon + 990 µl de tampon de dilution d'échantillon) et bien mélanger au vortex.
2. Ajouter 100 µl de chaque témoin, calibrateur, contrôle et échantillon dilué dans deux puits ; consulter le plan de plaque recommandé au point 8.
3. Couvrir la plaque avec une feuille de scellement et laisser incuber à température ambiante pendant 40 ± 5 min*) sur un vibreur agitateur horizontal de plaques (environ 500 – 700 tr/min).
4. À la fin du temps d'incubation, retirer le liquide et laver les puits en ajoutant 300 µl de tampon de lavage à chaque puits. Éliminer le plus de liquide possible et répéter l'opération jusqu'à effectuer un total de trois lavages. Si l'on utilise un laveur de plaques, vérifier que toutes les buses d'aspiration et de remplissage sont bien débouchées afin de garantir un lavage efficace de tous les puits. Après le lavage final, retourner la plaque et tapoter énergiquement les ouvertures des puits sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de tampon de lavage.
5. Mélanger doucement le contenu du flacon de conjugué avant son uti-

lisation (ne pas agiter). Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, préférablement à l'aide d'une pipette à répétition ou multi-canaux.
6. Couvrir la plaque avec une feuille de scellement et laisser incuber à température ambiante pendant 40 ± 5 min*) sur un vibreur agitateur horizontal de plaques (environ 500 – 700 tr/min).
7. Recommencer les étapes de lavage telles que décrites ci-dessus trois fois avec 300 µl de solution de lavage par puits.
8. Ajouter 100 µl de solution substrat dans chaque puits, préférablement à l'aide d'une pipette à répétition ou multi-canaux.
9. Laisser incuber la plaque à température ambiante (sans agiter) pendant 20 – 30 minutes, à l'abri de la lumière.
10. En option : Ajouter 100 µl de solution d'arrêt 1M NaOH à chaque puits si une période d'incubation fixe est requise.
11. Lire les valeurs de densité optique (D.O.) à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA. Si le lecteur de plaques possède cette option, agiter la plaque brièvement (2-3 secondes) avant la lecture.

*) **En option** : Temps d'incubation réduit (procédure manuelle). Le temps d'incubation peut être réduit à 30 ± 5 min sans changer les résultats. Une réduction des valeurs de D.O. peut être envisagée, et la valeur maximale de D.O. pour l'étalon supérieur (500 ng/ml) peut descendre au-dessous de la valeur recommandée de 1,800, mais cela n'a aucun effet sur les résultats.

10. RÉSULTATS

10.1 Valeurs de contrôle de qualité

- Une nouvelle courbe étalon doit être réalisée à chaque série de tests.
- Les contrôles positifs doivent être inclus à chaque série de tests. La valeur des contrôles doit être comprise dans les limites imprimées sur les étiquettes des flacons.
- À titre indicatif, la valeur de D.O. du calibrateur 5 (500 ng/ml) doit être ≥ 1,6 et celle du témoin (0 ng/ml) ≤ 0,25. Une courbe représentative de calibrateur est montrée à la figure 1.

10.2 Calcul des résultats

Calcul de la concentration de calprotectine dans les échantillons de selles des patients :

1. Calculer la moyenne des valeurs de D.O. de toutes les répétitions (témoins, calibrateurs et échantillons).
2. Représenter sous forme graphique la valeur de concentration du té-

moin et de chaque calibrateur (ng/ml) sur l'axe des abscisses en fonction de la valeur moyenne de la D.O. sur celui des ordonnées pour obtenir une courbe étalon. **Une fonction d'ajustement de la courbe à 4 paramètres est recommandée** (voir figure 1 ci-dessous). Si un axe des abscisses logarithmiques est requis, une valeur de 0,001 ng/ml doit être utilisée comme étalon A (0 ng/ml).

3. Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en calprotectine dans les échantillons dilués (ng/ml) à partir de leurs valeurs de D.O.
4. **Multiplier la concentration de calprotectine (ng/ml) dans les extraits de selles dilués par 5 pour effectuer la conversion en mg/kg de calprotectine dans l'échantillon de selles d'origine.**

Ce facteur corrige la dilution totale de 1/5000e (1/50e pendant la procédure d'extraction, puis la dilution au 1/100e des extraits) et convertit la valeur de ng/ml à mg/kg.

Exemple : si un échantillon d'extrait dilué possède une valeur de 100 ng/ml, la concentration dans l'échantillon original de selles était de 100 x 5 = 500 mg/kg.

Remarque: Si les extraits ont été dilués davantage (ou moins) que la valeur recommandée de 1/100, le facteur de dilution supplémentaire doit être saisi dans le calcul.

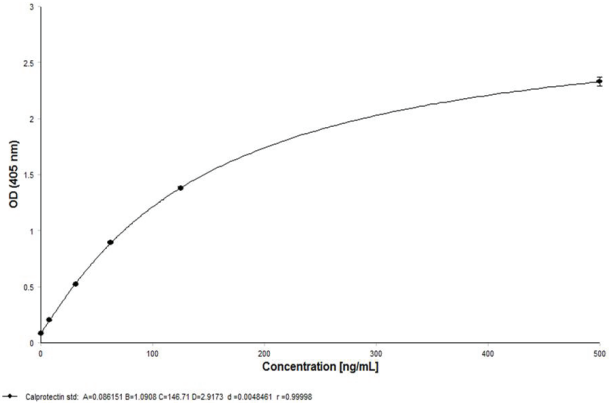


Figure 1 : Courbe étalon représentative utilisant un ajustement de courbe à 4 paramètres.

10.3 Interprétation des résultats

Les valeurs suivantes de calprotectine dans les échantillons de selles sont issues de la bibliographie [3, 25]:

Valeur normale	5 – 50 mg/kg
Valeur positive	> 50 mg/kg
Valeur moyenne chez des patients atteints de cancers colorectaux symptomatiques	350 mg/kg
Maladie inflammatoire chronique intestinale active	200 – 40 000 mg/kg

Le diagnostic ne doit pas toutefois pas être établi sur la seule base d'un résultat de test. Il doit prendre en considération le dossier clinique et les symptômes.

Les valeurs suivantes de calprotectine ont été relevées chez 100 donneurs de sang sains (50 hommes et 50 femmes):

Type d'échantillon:	**Moyenne (µg/L):**	**Écart-type:**
Plasma EDTA	627	307

11. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

Le diagnostic ne doit pas être établi sur la seule base d'un résultat de test.

12. CARACTÉRISTIQUES DES PERFORMANCES

Remarque : Toutes les études de vérification de la conception ont été réalisées moyennant test manuel sur des échantillons d'extraits de selles (dilués au 1/100e) ou des échantillons de plasma EDTA (dilués au 1/20e) à l'aide de la procédure ELISA décrite au point 9.

Précision inter-essai et intra-essai sur des extraits de selles et précision intra-essai sur du plasma EDTA:

Précision inter-essai, extraits de selles*		Précision intra-essai, extraits de selles**		Précision intra-essai, plasma EDTA***	
Concentration dans les selles (mg/kg)	% C.V.	Concentration dans les selles (mg/kg)	% C.V.	Concentration dans le plasma (µg/L)	% C.V.
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

*Résultats moyens de trois laboratoires différents, chacun d'eux ayant testé deux lots de kit différents : six échantillons ont été testés 10 fois sur cinq jours
** Résultats moyens de trois laboratoires différents, chacun d'eux ayant testé deux lots de kit : six échantillons ont été testés avec 10 répétitions sur une même série
*** Testé sur un seul lot de kit ; six échantillons ont été dilués au 1/20e et testés avec 10 répétitions sur une même série

Récupération:
Selles: 85 – 105 % ; testé sur des extraits de selles auxquels ont été ajoutés cinq niveaux différents de calprotectine purifiée.
Plasma: 81 – 105 % ; testé avec du plasma auquel ont été ajoutés cinq niveaux différents de calprotectine purifiée.

Limite de quantification:
5 ng/ml; testé avec des extraits de selles, du plasma et de la calprotectine purifiée. Les échantillons ont été analysés cinq fois sur cinq jours. Le C.V. moyen des différents échantillons et déterminations à ce niveau était de 12 %.

Limite de détection:
< 5 ng/ml ; calculé comme une moyenne (tampon de dilution d'échantillon ; n= 32) + 5 x écart-type.

Interférence
Aucune interférence n'a été observée entre l'ELISA et les médicaments habituellement utilisés : prednisolone, Imurel, salazopyrine et ciprofloxacine.

Précision de l'extraction
Deux échantillons de selles ont été extraits 10 fois chacun, en utilisant la procédure décrite au point 7.1.2, et les extraits ont été analysés à l'ELISA. Résultats moyens de trois laboratoires différents sur un lot de kit :

Échantillon	Concentration (mg/kg)	% C.V.
Faible	130	8.7
Fort	1357	8.8

Linéarité, extraits de selles
Des extraits de selles (n = 10) ont été dilués au 1/100e – 1/1 000e, puis analysés au test ELISA. Résultats moyens:

Dilution	% de dilution au 1/100e
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Une variation de la linéarité des échantillons a été observée.

Linéarité, plasma EDTA
Des échantillons de plasma (n=5) ont été dilués au 1/20e – 1/80e et analysés au test ELISA. Résultats moyens:

Dilution	% de dilution au 1/20e
1:20	100
1:40	107
1:80	116

Une variation de la linéarité des échantillons a été observée.

13. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

- En vertu de l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/CE, l'utilisation de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est conçue de la part du fabricant pour garantir la convenance, performance et sécurité du produit. La procédure de test, l'information, les précautions et les avertissements contenus dans le mode d'emploi doivent donc être strictement respectés. L'utilisation des kits de test avec des analyseurs ou un équipement similaire doit être validée. Toute modification de la conception, composition et procédure de test, ainsi que toute utilisation en association avec d'autres produits non approuvés par le fabricant est interdite ; l'utilisateur lui-même est responsable de telles modifications. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et incidents dus à de telles causes. Le fabricant n'est pas responsable des résultats issus d'une simple analyse visuelle des échantillons du patient.
- Utilisation réservée au seul diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la production de ces réactifs ont été testés avec des anticorps anti-VIH, des anticorps anti-HCV et un antigène de l'hépatite B (Bag). Les résultats obtenus montrent qu'ils ne sont pas réactifs. Quoi qu'il en soit, tout le matériel doit être considéré et manipulé comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger des réactifs ou des bandes appartenant à des lots de production différents.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec des réactifs de ce kit de test.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration indiquée sur l'étiquette ou 1 mois après avoir préparé les solutions de travail à partir des réactifs concentrés.
- N'utiliser que des embouts de pipette, distributeurs et matériel de laboratoire propres.
- Pour éviter toute contamination croisée, ne pas interchanger les bouchons vissants des flacons de réactifs.
- Bien refermer les flacons de réactifs immédiatement après l'usage pour éviter toute évaporation et contamination microbienne.
- Après l'ouverture et le stockage, vérifier l'absence de contamination microbienne dans les flacons de conjugué, calibrateurs et contrôles avant de les réutiliser.

- Pour éviter toute contamination croisée et des résultats faussement élevés, pipetter lescalibrateurs, contrôles et échantillons d'extraits de selles et distribuer le conjugué et substrat avec précision dans le fond des puits des plaques microtitres, sans éclabousser.
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium à moins de 0,1 % (p/v) et/ou 0,1 % de Kathon.
- Stocker la solution substrat dans sa bouteille opaque originale ; la solution doit être transparente ou jaune pâle. Mélanger légèrement avant usage.
- Le kit **BIOHIT Calprotectin ELISA** est conçu pour être utilisé par un personnel qualifié, formé aux bonnes pratiques de laboratoire.

13.1 Considérations relatives à l'élimination
Les déchets de produits chimiques et préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est assujettie aux lois et réglementations nationales et régionales. Veuillez contacter les autorités locales ou des sociétés de gestion des déchets qui vous informeront sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

14. GARANTIE
Biohit est tenu de remédier à tout défaut découvert dans un produit quel qu'il soit (le « Produit défectueux ») résultant de l'emploi de composants inappropriés ou d'une qualité de fabrication négligente, qui empêche le fonctionnement ou l'utilisation prévue du produit, y compris, mais pas uniquement, les fonctions indiquées parmi les spécificités des produits établies par Biohit. CEPENDANT, LA PRÉSENTE GARANTIE N'EST PAS APPLICABLE SI LE DÉFAUT A ÉTÉ CAUSÉ PAR UNE UTILISATION IMPROPRE OU ABUSIVE DU PRODUIT, UN DOMMAGE ACCIDENTEL, UNE CONSERVATION INCORRECTE OU ENCORE L'UTILISATION DU PRODUIT POUR DES OPÉRATIONS HORS DES LIMITATIONS OU CARACTÉRISTIQUES, OU CONTRAIRES AUX INSTRUCTIONS FOURNIES PAR CE MODE D'EMPLOI. La période de garantie est définie dans le mode d'emploi et prend effet à compter de la date d'expédition du Produit par Biohit. Ce coffret de diagnostic Biohit a été fabriqué conformément aux protocoles de gestion de la qualité définis par la norme ISO 9001 / ISO 13485. En cas de litiges, c'est la version anglaise du texte qui s'applique.

15. RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE À SUIVRE

Kit BIOHIT Calprotectin ELISA pour l'analyse de calprotectine dans les selles
Se reporter aux points 7 – 9 de la notice contenue dans l'emballage pour une description complète de la procédure, ainsi que pour l'analyse de plasma/sérum.

Extraction
Effectuer l'extraction conformément à l'une des méthodes décrites aux points 7.1.1 – 7.1.2

ELISA (procédure manuelle)
- Diluer des extraits de selles au 1/100e dans le tampon de dilution d'échantillon
- Ajouter 100 µL de chaque calibrateur, contrôle, témoin et échantillon sur la plaque ELISA
- Laisser incuber sur un vibreur agitateur de plaques à température ambiante pendant 40 ± 5 min*)
- Laver les puits trois fois avec 300 µl de tampon de lavage
- Ajouter 100 µL de solution de conjugué dans chaque puits
- Laisser incuber sur un vibreur agitateur de plaques à température ambiante pendant 40 ± 5 min*)
- Laver les puits trois fois avec 300 µl de tampon de lavage
- Ajouter 100 µL de solution substrat à chaque puits
- Couvrir et laisser incuber pendant 20 – 30 min
- En option : ajouter 100 µL de 1M NaOH à chaque puits
- Lire les valeurs de D.O. à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA
- Calculer les résultats (ng/ml) à l'aide d'un ajustement de courbe à 4 paramètres
- mg/kg dans les selles = ng/ml × 5

*) peut être réduit à 30 ± 5 min si l'essai est réalisé manuellement.

Pour toute question, prière de contacter info@biohit.fi

ESPAÑOL

INSTRUCCIONES DE USO

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Cat. Nº. 602 260

1. USO PREVISTO 81
2. ANTECEDENTES 81
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA 82
4. MATERIALES 83
4.1. Reactivos facilitados con el kit 83
4.2. Materiales facilitados con el kit 84
4.3. Materiales necesarios que no se suministran 84
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO 85
6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS 85
6.1. Tiras recubiertas de la placa de pocillos 85
6.2. Amortiguador para la dilución de muestras 86
6.3. Amortiguador para lavado 86
6.4. Amortiguador para extracción fecal 86
6.5. Calibradores, blanco y controles 86
6.6. Solución conjugada 86
7. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS 87
7.1. Muestras fecales 87
7.1.1. Extracción mediante tubos de extracción BIOHIT 88
7.1.2. Extracción mediante el método de pesada 88
7.2. Muestras de plasma y suero 89
8. SUGERENCIA DE ESQUEMA DE PLACA 89
9. MÉTODO ANALÍTICO 90
9.1 Notas sobre el procedimiento 90
9.2 Procedimiento de ELISA 91
10. RESULTADOS 92
10.1 Valores del control de calidad 92
10.2 Cálculo de los resultados 92
10.3 Interpretación de los resultados 93
11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO 94
12. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS 94
13. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES 96
13.1 Consideraciones respecto a la eliminación 97
14. GARANTIA 97
15. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO 99

1. USO PREVISTO

BIOHIT Calprotectin ELISA es un método cuantitativo para la detección de calprotectina en muestras de heces. Puede usarse como complemento en la identificación de una enfermedad orgánica del intestino delgado, el intestino grueso o el estómago de los pacientes, para determinar la actividad de la enfermedad y controlar la respuesta al tratamiento en pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. **BIOHIT Calprotectin ELISA** está validado para muestras de heces. **La prueba está destinada a uso diagnóstico *in vitro*.**

2. ANTECEDENTES

La calprotectina es una proteína de fijación al calcio y zinc de 36 kilodaltonios[1] que liberan sobre todo los leucocitos, en concreto los neutrófilos polimorfonucleares (NPM), en la luz intestinal durante la inflamación de la mucosa intestinal. Los microorganismos del intestino estimulan la migración de los leucocitos a la luz intestinal, donde liberan su contenido, que incluye sustancias antimicrobianas como la calprotectina. Esta proteína constituye alrededor del 60 % del total de proteínas que hay en el citoplasma de los NPM[2] y puede estimarse de manera fiable en muestras fecales almacenadas hasta siete días a temperatura ambiente[3].

Distintos tipos de enfermedad, como las infecciones bacterianas, la artritis reumatoide y el cáncer, conllevan la activación de los NPM y el aumento de los niveles de calprotectina en plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido crevicular, orina u otras sustancias del cuerpo humano[4].

Existe una relación entre la concentración de calprotectina en las heces y el número de NPM que migran a la luz intestinal[5]; dicha concentración puede detectarse de forma fiable incluso en muestras fecales aleatorias de pequeño tamaño (inferiores a un gramo)[3,6]. Las enfermedades orgánicas del intestino arrojan una fuerte señal de calprotectina; los aumentos, en general, superan el nivel de referencia máximo de los individuos sanos entre cinco y varios miles de veces[3,7-9], lo que indica la existencia de inflamación intestinal. Las enteropatías inflamatorias (EI), como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, pueden aparecer entre la niñez temprana y el final de la edad adulta, y el diagnóstico suele ser tardío debido a la vaguedad de los síntomas o la renuencia a someterse a endoscopias y biopsias. **BIOHIT Calprotectin ELISA** puede contribuir a un diagnóstico más temprano de las EI, ya que la prueba suele arrojar un resultado

positivo cuando hay una EI activa.

Los trastornos funcionales, como el síndrome del intestino irritable (SII) no provocan un aumento de la concentración de calprotectina fecal, a diferencia de los trastornos abdominales orgánicos, como las EI. Los pacientes con trastornos abdominales orgánicos y funcionales pueden tener síntomas similares y la exploración clínica por sí sola puede no ser suficiente para obtener un diagnóstico específico. La prueba de calprotectina fecal es un método sencillo, no invasivo, económico y objetivo que puede ayudar a seleccionar pacientes para someterlos a exploraciones adicionales, como la endoscopia. Los síntomas abdominales son muy frecuentes tanto en niños como en adultos y un resultado negativo medido por **BIOHIT Calprotectin ELISA** puede descartar, con un gran índice de probabilidad, las enteropatías inflamatorias[7].

La curación de la mucosa es el objetivo principal del tratamiento de las EI y una prueba de calprotectina fecal demuestra si dicha curación se ha producido. Muchos pacientes de EI en remisión clínica con niveles normales de proteína C reactiva (PCR) siguen teniendo inflamación[10], reflejada por un aumento de la calprotectina fecal. Estos pacientes tienen mayor riesgo de sufrir una recaída al cabo de pocos meses[11]. Si se logra la curación de la mucosa, se reducirá el riesgo de recaída y la necesidad de cirugía abdominal mayor[12,13]. La normalización de los niveles de calprotectina indica que se ha logrado la curación de la mucosa[14]. Nuestra tecnología ELISA para calprotectina se ha usado también para analizar muestras de suero y plasma y se han detectado niveles elevados de calprotectina en pacientes con infecciones bacterianas[15,16], septicemia y patologías inflamatorias, como artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso diseminado (LED)[17-21]. Diversas publicaciones científicas demuestran que la calprotectina en suero/plasma es un indicador excelente de la actividad de la enfermedad en casos de AR y LED y puede prevenir su reagudización. También es un buen marcador de episodios de la arteria coronaria agudos que conlleven infarto de miocardio[22-24].

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

BIOHIT Calprotectin ELISA se basa en la preparación de un extracto de heces mediante un amortiguador para extracción fecal. El nivel de calprotectina se determina analizando el extracto en un enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) específico para la calprotectina.

En el ELISA, las muestras y calibradores se incuban en pocillos distintos recubiertos de anticuerpos monoclonales que fijan la calprotectina. Tras la incubación y el lavado de los pocillos, la calprotectina fijada puede reaccionar con anticuerpos específicos para la calprotectina, marcados enzimáticamente y purificados mediante inmunoafinidad. Tras esta reacción, la cantidad de enzima fijada en los pocillos es proporcional a la cantidad de calprotectina que hay en la muestra o el patrón, que viene determinada por la incubación con un sustrato para la enzima, lo que resulta en un producto coloreado. La intensidad del color viene determinada por la absorbencia utilizando un lector de placas ELISA y es proporcional a la concentración de calprotectina en los calibradores y muestras. El análisis se calibra mediante calprotectina purificada procedente de extracto de leucocitos.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos facilitados con el kit

Placa de pocillos recubiertos: 12 tiras, 8 pocillos por tiras, recubiertas con anticuerpos murinos monoclonales purificados mediante afinidad específicos para la calprotectina. La placa viene almacenada en una bolsa sellada con desecante.

DILBUF 5x **Amortiguador para dilución de muestras (conc. 5x) *****: 1 unidad de 20 ml, en concentración 5x, para diluir en agua destilada/desionizada; solución de color amarillo con pH 8,0 ± 0,2, frasco con tapón azul.

WASH 20x **Amortiguador para lavado (conc. 20x) ***: 1 unidad de 50 ml, en concentración 20x, para diluir en agua destilada/desionizada, para el lavado de los pocillos; solución transparente con pH 7,8 ± 0,2, frasco con tapón blanco.

FEC EXTRBUF 2.5X **Amortiguador para extracción fecal (conc. 2,5x) ****: 2 unidades de 90 ml, en concentración 2,5x, para diluir en agua destilada/desionizada; solución transparente con pH 7,8 ± 0,2, frascos con tapón blanco.

CAL 1-5 **Calibradores de calprotectina 1-5 y** **BLANK** *******: 6 viales de 1,0 ml, solución de color amarillo lista para usar, viales con tapones de distinto color:

Blanco: tapón azul	0	ng/ml
Calibrador 1: tapón verde	7,8	ng/ml
Calibrador 2: tapón amarillo	31,3	ng/ml
Calibrador 3: tapón rojo	62,5	ng/ml
Calibrador 4: tapón blanco	125	ng/ml
Calibrador 5: tapón negro	500	ng/ml

CONTROL LOW **CONTROL HIGH** **Controles "bajo" y "alto" *****: 2 viales de 1,0 ml, solución de color amarillo lista para usar; control bajo: vial con tapón marrón; control alto: vial con tapón morado.

CONJ **Solución conjugada ******: 113 ml de solución de color rojo, lista para usar, con anticuerpos policlonales de conejo contra la calprotectina marcados con fosfatasa alcalina y purificados mediante inmunoafinidad, en un tubo de reactivo Dynex de 25 ml con tapón blanco.

SUBS **Solución de sustrato (pNPP)**: 113 ml de solución lista para usar, de color transparente a amarillo claro, en frasco opaco con tapón amarillo. El frasco contiene sedimentos de estabilización.

Nota: Si se usa un instrumento Dynex, el sustrato debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis.

* Contiene 0,1 % de Kathon.
** Contiene <0,1 % de acida de sodio
*** Contiene 0,1 % de Kathon y <0,1 % de acida de socio
**** Contiene 0,02 % de metilisotiazolona y 0,02 % de bromonitrodioxano

4.2. Materiales facilitados con el kit
- 2 láminas de sellado
- 1 protocolo de análisis
- 1 esquema de placa

4.3. Materiales necesarios que no se suministran
- Agua destilada/desionizada
- Aparatos de extracción (ver secciones 7.1.1 y 7.1.2)
- Asas bacteriológicas desechables y rompibles (si se usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Balanza digital sensible (40-150 mg) (si se usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Tubos desechables con tapón de rosca de poliestireno, de 5 ml (si se

usa el método de pesada de la sección 7.1.2)
- Agitador vórtex
- Tubos desechables para la dilución de las muestras: Tubos eppendorf o similares (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Pipetas para aplicar volúmenes de 10-1000 µl (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Pipeta repetidora o pipeta multicanal, de 100 µl (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Limpiador de pocillos o pipeta multicanal, de 300 µl (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Agitador de placas (500-700 rpm) (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Temporizador (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- Lector de placas, filtro de 405 nm (si el análisis se lleva a cabo de forma manual)
- 1M NaOH (solución de frenado; optativa)

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Si se almacenan sin abrir a 2-8 °C, los reactivos del kit permanecen estables hasta la fecha de caducidad que indica la etiqueta.
Las placas, reactivos y amortiguadores concentrados que se hayan abierto permanecen estables hasta un máximo de tres meses si se almacenan a 2-8 °C.

Si se preparan en recipientes limpios, las soluciones de trabajo (1x) de amortiguador para lavado, amortiguador para la dilución de muestras y amortiguador para la extracción fecal pueden almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de un mes.

Evitar la exposición a altas temperaturas y a la luz directa del sol.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, muestras y controles deben llevarse a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de empezar el análisis.

6.1. Tiras recubiertas de la placa de pocillos

Las tiras de la placa están listas para usar y vienen recubiertas con anticuerpos murinos monoclonales purificados mediante afinidad específicos para la calprotectina. Las tiras que no se usen deben eliminarse de la estructura y volverse a sellar inmediatamente en bolsa de papel de

aluminio junto con el desecante suministrado. Almacenar a 2-8 °C.

6.2. Amortiguador para la dilución de muestras
Diluir el amortiguador para dilución de muestras concentrado a 5x añadiendo 1 parte (20 ml) a 4 partes (80 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 100 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador para la dilución de muestras diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.
Nota: Si se usa un instrumento automático Dynex DS2 o DSX ELISA, el amortiguador para la dilución de muestras debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis.

6.3. Amortiguador para lavado
Diluir el amortiguador para lavado concentrado a 20x añadiendo 1 parte (50 ml) a 19 partes (950 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 1000 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador para lavado diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

6.4. Amortiguador para extracción fecal
Diluir el amortiguador para extracción fecal concentrado a 2,5x añadiendo 1 parte (90 ml) a 1.5 partes (135 ml) de agua destilada/desionizada en un recipiente limpio para obtener un volumen final de 225 ml. Mezclar bien. Almacenar el amortiguador diluido en un recipiente cerrado a 2-8 °C.

6.5. Calibradores, blanco y controles
Los viales marcados como blanco, calibrador y controles contienen cada uno 1,0 ml de una solución lista para usar. La concentración de calprotectina viene impresa en la etiqueta de cada vial. Los viales encajan directamente en los instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA.

6.6. Solución conjugada
El tubo contiene 13 ml anticuerpos de conejo contra la calprotectina marcados con fosfatasa alcalina (FA) y purificados mediante inmunoafinidad en un amortiguador con estabilizantes, conservantes y un tinte rojo inerte. La solución viene lista para usar. El tubo encaja directamente en los instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA.

6.7. Solución de sustrato
El frasco contiene 13 ml de solución de p-nitrofenilfosfato (pNPP). La solución viene lista para usar y debe almacenarse en su frasco opaco original.
Nota: Si se usa un instrumento automático Dynex DS2 o DSX ELISA, la solución de sustrato enzimático debe transferirse a un tubo de reactivo Dynex de 25 ml antes de realizar el análisis. Debe evitarse transferir los sedimentos de estabilización.

7. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS
BIOHIT Calprotectin ELISA se ha elaborado y validado principalmente para muestras fecales, pero también puede usarse con muestras de plasma/suero.

7.1. Muestras fecales
Dado que la calprotectina es muy estable en las heces, los pacientes pueden obtener pequeñas muestras fecales en casa. Se debe recoger una muestra de 1-5 g (aproximadamente, una cucharadita), introducirla en un recipiente limpio apropiado y enviarla al laboratorio lo antes posible, en un plazo máximo de cuatro días. Si se introduce en un recipiente apto para el transporte, puede enviarse por correo ordinario; es decir, no se necesita refrigeración. Debe evitarse exponer la muestra a temperaturas superiores a 30 °C.

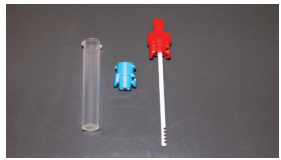
Las muestras también pueden almacenarse congeladas, a -20 °C o menos, hasta su entrega o envío. Las muestras congeladas deben descongelarse y equilibrarse hasta la temperatura ambiente antes de la extracción y el análisis. Téngase en cuenta que al congelar muestras fecales pueden aumentar en ocasiones los niveles de calprotectina, debido, muy probablemente, a su liberación a partir de los granulocitos.

Nota: Antes de comenzar la extracción, la muestra fecal debe homogeneizarse bien, usando, por ejemplo, una espátula, antes de retirar la pequeña cantidad para la extracción.

Para la extracción, recomendamos usar tubos de extracción BIOHIT o los otros métodos que se describen a continuación (capítulos 7.1.1 y 7.1.2). Realizar la extracción de acuerdo con el prospecto del envase correspondiente al dispositivo/método de extracción escogido. Pueden emplearse otros métodos y dispositivos validados por el cliente.

7.1.1. Extracción mediante tubos de extracción BIOHIT

Instrucciones de uso: leer el prospecto del envase del producto ref. 602 270.



7.1.2. Extracción mediante el método de pesada (sin dispositivo de extracción)

1. Pesar (tarar) un tubo vacío con tapón de rosca con un asa bacteriológica.
2. Tomar aproximadamente 100 mg (entre 40 y 120 mg) de heces mediante el asa bacteriológica e introducirlos en el tubo con tapón de rosca. Evitar tomar material sólido no digerido, como fibras y semillas.
3. Pesar el tubo y el asa con heces, con lo que se obtendrá el peso neto de las heces.
4. Romper o cortar la mitad superior del asa bacteriológica y dejar la parte inferior dentro del tubo.
5. Añadir amortiguador para extracción en una proporción peso: volumen de 1:50; por ejemplo, 4,9 ml de amortiguador a 100 mg de heces. Cerrar el tubo.
6. Mezclar vigorosamente durante 30 segundos mediante un agitador vórtex.
7. Seguir mezclando en un agitador (a aproximadamente 1000 rpm) durante 30±5 minutos con el asa dentro del tubo a modo de agitador.
8. Dejar un par de minutos sobre el mostrador para que las partículas se asienten y pipetear con cuidado desde la parte superior del tubo. No es necesario centrifugar, aunque se puede llevar a cabo un breve centrifugado si se necesita una solución sin partículas.
9. El extracto, que representa una dilución 1:50 (peso:volumen) de la muestra de heces, ya está lista para la dilución y el análisis.
10. Para el almacenamiento, transferir aproximadamente 0,5 ml a un nuevo tubo. Los extractos pueden almacenarse a 2-8 °C durante un máximo de cinco días o congelarse por debajo de -20 °C durante un máximo de 2 años.

7.2. Muestras de plasma y suero

Para obtener unos niveles precisos de calprotectina en suero o plasma, es necesario que no se libere la proteína desde los neutrófilos de la sangre *in vitro*. En el caso del plasma, el anticoagulante de preferencia es EDTA.

Procedimiento recomendado para la preparación de muestras:

1. Extraer la sangre mediante vacutainers.
2. Centrifugar la sangre a 3000 rpm durante 10 minutos lo antes posible y antes de que transcurran tres horas desde la obtención de la muestra.
3. Extraer únicamente los dos tercios superiores de la capa de suero o plasma mediante un pipeteo cuidadoso, a fin de no aspirar los leucocitos de la capa leucocitaria.

Para ELISA, diluir el plasma o suero en proporción 1:20 (p. ej., 50 µl de muestra + 950 µl de amortiguador para dilución de muestras) y seguir el procedimiento de análisis que se describe en la sección 9.

8. SUGERENCIA DE ESQUEMA DE PLACA

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrador 5 500 ng/ml	Calibrador 5 500 ng/ml	Muestra 1	Muestra 1		
B	Calibrador 4 125 ng/ml	Calibrador 4 125 ng/ml	Muestra 2	Muestra 2		
C	Calibrador 3 62,5 ng/ml	Calibrador 3 62,5 ng/ml	Muestra 3	Muestra 3		
D	Calibrador 2 31,3 ng/ml	Calibrador 2 31,3 ng/ml	Muestra 4	Muestra 4		
E	Calibrador 1 7,8 ng/ml	Calibrador 1 7,8 ng/ml	Muestra 5	Muestra 5		
F	Blanco 0 ng/ml	Blanco 0 ng/ml	Muestra 6	Muestra 6		
G	Control “bajo”	Control “bajo”	Muestra 7	Muestra 7		
H	Control “alto”	Control “alto”	Muestra 8	Muestra 8		

Sugerencia de esquema de placa ELISA para calibradores, controles y muestras siguiendo un procedimiento manual. Se recomienda duplicar

los pocillos para aumentar la fiabilidad de los resultados. En una placa completa caben 40 muestras.

9. MÉTODO ANALÍTICO

El siguiente procedimiento se refiere al análisis manual. Se pueden solicitar protocolos validados para instrumentos automáticos Dynex DS2 y DSX ELISA. Debe tenerse en cuenta que los viales para calibrador, blanco y control positivo, así como el tubo de conjugado, encajan directamente en los instrumentos automáticos DS2 o DSX ELISA. También pueden usarse otros instrumentos automáticos para ELISA, pero el cliente debe validarlos previamente.

9.1 Notas sobre el procedimiento

- Preparación: Leer con atención el protocolo de análisis antes de llevarlo a cabo. La fiabilidad de los resultados depende de que se siga escrupulosamente el protocolo de análisis descrito. Antes de comenzar el análisis, debe establecerse minuciosamente un esquema de placa para todos los blancos, calibradores, controles y muestras, utilizando, por ejemplo, la hoja que se incluye en el kit. Seleccionar el número necesario de tiras de la placa. Las tiras que no se usen deben volverse a sellar inmediatamente en bolsa de papel de aluminio y almacenarse según se describe en la sección 6.1.
- Se recomienda emplear una dilución a 1:100 de extractos de heces. Esta dilución arrojará unos resultados de muestra de entre 25 mg/kg (límite de cuantificación) y 2500 mg/kg en heces. Los extractos con valores de calprotectina más altos pueden diluirse más (> 1:100) y volverse a someter análisis si se necesita un valor. Los extractos con valores de calprotectina bajos pueden diluirse menos (1:50). El factor de dilución ajustado debe tenerse en cuenta al convertir de ng/ml a mg/kg (véase la sección 10, más adelante).
- Llevar a cabo todos los pasos del análisis en el orden indicado y sin demoras apreciables entre ellos.
- Debe usarse una punta de pipeta limpia y desechable para dispensar cada patrón, control y muestra.
- Para obtener unos resultados lo más fiables posible, los blancos, calibradores, controles y muestras de pacientes deben analizarse siempre por duplicado.
- Todas las muestras y reactivos del kit deben equilibrarse a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de empezar el análisis.

9.2 Procedimiento de ELISA

1. Diluir las muestras de extracto de heces a 1:100 (p. ej., 10 µl de muestra + 990 µl de amortiguador para dilución de muestras) y mezclar bien mediante el agitador vórtex.
2. Añadir 100 µl de cada blanco, calibrador, control y muestra diluida en pocillos duplicados; véase el esquema de placa recomendado en la sección 8.
3. Tapar la placa con una lámina de sellado e incubar a temperatura ambiente durante 40±5 minutos* en un agitador de placas horizontal (aproximadamente, a 500-700 rpm).
4. Al final del tiempo de incubación, retirar el líquido y lavar los pocillos añadiendo 300 µl de amortiguador para lavado a cada pocillo. Retirar tanto líquido como sea posible y repetir hasta que se hayan realizado un total de tres lavados. Si se usa un limpiador de placas, comprobar no haya ninguna sonda de aspirado y llenado bloqueada para garantizar el correcto lavado de todos los pocillos. Tras el lavado final, invertir la placa y golpear con fuerza la aberturas de los pocillos sobre papel absorbente para eliminar cualquier resto de amortiguador para lavado.
5. Mezclar el contenido del vial de conjugado suavemente antes de usarlo (sin agitarlo). Añadir 100 µl de conjugado a cada pocillo; preferiblemente, con una pipeta repetidora o multicanal.
6. Tapar la placa con una lámina de sellado e incubar a temperatura ambiente durante 40±5 minutos* en un agitador de placas horizontal (aproximadamente, a 500-700 rpm).
7. Repetir los pasos de lavado arriba descritos, tres veces con 300 µl de solución de lavado por pocillo.
8. Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo; preferiblemente, con una pipeta repetidora o multicanal.
9. Incubar la placa a temperatura ambiente (sin agitar) durante 20-30 minutos, protegida de la luz.
10. Optativo: Añadir 100 µl de solución de frenado 1M NaOH a cada pocillo si se necesita un periodo de incubación fijo.
11. Leer los valores de densidad óptica (DO) a 405 nm usando un lector de ELISA. Si el lector de placas tiene esta opción, agitar brevemente la placa (2-3 segundos) antes de la lectura.

* **Optativo**: Tiempo de incubación reducido (procedimiento manual). El tiempo de incubación puede reducirse a 30±5 minutos sin que los resultados se vean modificados. Tal vez se observe una reducción de los valores de DO, y el valor máximo de DO del patrón superior (500 ng/ml) puede descender del valor recomendado de 1,800, pero ello no

afecta a los resultados.

10. RESULTADOS

10.1 Valores del control de calidad

- Debe incluirse una nueva curva de patrón en cada tanda.
- Los controles positivos deben incluirse en cada tanda. El valor de los controles debe encontrarse dentro de los límites impresos en las etiquetas de los viales.
- A modo de guía, el valor de DO del calibrador 5 (500 ng/ml) debe ser ≥ 1,6, mientras que el valor de DO del blanco (0 ng/ml) debe ser ≤ 0,25. En la figura 1 se muestra una curva de calibrador representativa.

10.2 Cálculo de los resultados

Cálculo de la concentración de calprotectina en muestras fecales de pacientes:

1. Calcular los valores medios de DO de todos los pocillos duplicados (blanco, calibradores y muestras).
2. Trazar el valor del blanco y de cada calibrador y la concentración (ng/ml) en el eje de la x frente a su valor de DO medio en el eje de la y para obtener una curva de patrón. **Se recomienda una función de ajuste de curvas de 4 parámetros** (véase la figura 1, a continuación). Si se necesita un eje de la x logarítmico, debe usarse un valor de 0,001 ng/ml para el patrón A (0 ng/ml).
3. Usar la curva de calibración para determinar la concentración de calprotectina en las muestras diluidas (ng/ml) de acuerdo con sus valores de DO.
4. **Multiplicar la concentración de calprotectina (ng/ml) en los extractos fecales diluidos por 5 para convertir a mg/kg de calprotectina en la muestra de heces original.**

Este factor efectúa la corrección para la dilución total de 1:5000 (1:50 durante el procedimiento de extracción y la posterior dilución a 1:100 de los extractos) y convierte el valor de ng/ml a mg/kg.

Ejemplo: si una muestra de extracto diluido tiene un valor de 100 ng/ml, la concentración en la muestra fecal original era de 100 x 5 = 500 mg/kg.

Nota: Si los extractos se han diluido en una relación mayor (o menor) al

1:100 recomendado, el factor de dilución adicional deberá introducirse en el cálculo.

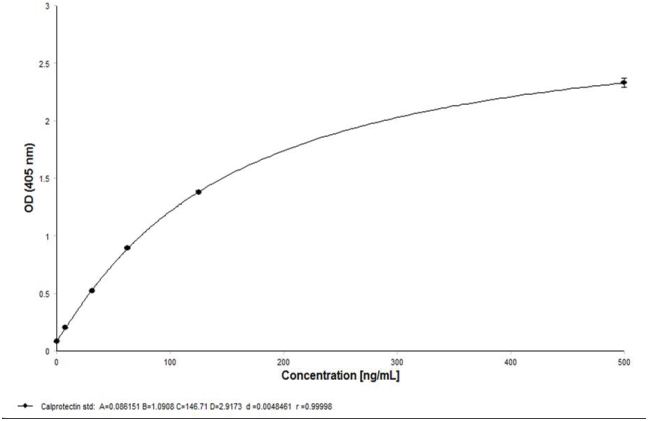


Figura 1: Una curva de patrón representativa usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

10.3 Interpretación de los resultados

En diversas publicaciones se han señalado los siguientes valores de calprotectina en muestras fecales[3,25]:

Valor normal	5 – 50 mg/kg
Valor positivo	> 50 mg/kg
Valor mediano en pacientes con cánceres colorrectales sintomáticos	350 mg/kg
Enteropatía inflamatoria activa sintomática	200 – 40 000 mg/kg

Téngase en cuenta que no se debe establecer un diagnóstico partiendo del resultado de un solo análisis. El diagnóstico debe tomar en consideración los antecedentes clínicos y los síntomas.

Se han detectado los siguientes niveles de calprotectina en sangre de 100 donantes de sangre sanos (50 hombres y 50 mujeres):

Tipo de muestra:	Media (µg/L):	DE:
Plasma con EDTA	627	307

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se debe establecer un diagnóstico partiendo del resultado de un solo análisis.

12. CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS

Nota: Todos los estudios de verificación del diseño se llevaron a cabo mediante análisis manual de muestras de extractos fecales (diluidas a 1:100) o muestras de plasma con EDTA (diluidas a 1:20), siguiendo el procedimiento de ELISA que se describe en la sección 9.

Precisión entre análisis y dentro del mismo análisis de los extractos fecales, y precisión dentro del mismo análisis del plasma con EDTA:

Precisión entre análisis, extractos fecales*		Precisión dentro del mismo análisis, extractos fecales**		Precisión dentro del mismo análisis, plasma con EDTA***	
Concentración en heces (mg/kg)	% CV	Concentración en heces (mg/kg)	% CV	Concentración en plasma (µg/l)	% CV
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

*Resultados medios de tres laboratorios distintos, cada uno de los cuales analizó dos lotes de kits distintos: se analizaron seis muestras un total de 10 veces a lo largo de cinco días

** Resultados medios de tres laboratorios distintos, cada uno de los cuales analizó dos lotes de kits distintos: se analizaron seis muestras con 10 réplicas en una tanda

*** Analizado un lote de kits; seis muestras se diluyeron a 1:20 y se analizaron con 10 réplicas en una tanda

Recuperación:
Heces: 85-105 %; analizados con extracto fecal al que se añadió calprotectina purificada en cinco niveles distintos.
Plasma: 81-105 %; analizados con plasma al que se añadió calprotectina purificada en cinco niveles distintos.

Límite de cuantificación:
5 ng/ml; analizados con extracto de heces, plasma y calprotectina purificada. Las muestras se analizaron cinco veces a lo largo de cinco días. El CV medio de las distintas muestras y determinaciones en este nivel fue del 12 %.

Límite de detección:
< 5 ng/ml; calculado como media (amortiguador para dilución de muestras; n = 32) + 5x DE.

Interferencia
No se observó interferencia en ELISA procedente de medicamentos de uso frecuente: prednisolona, imurel, salazopirina y ciprofloxacina.

Precisión de la extracción
Se extrajeron dos muestras de heces 10 veces cada una, siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 7.1.2, y los extractos se analizaron en ELISA. Resultados medios de tres laboratorios distintos y un lote de kits:

Muestra	Concentración (mg/kg)	% CV
Baja	130	8.7
Alta	1357	8.8

Linealidad, extractos de heces
Los extractos de heces (n=10) se diluyeron a 1:100-1:1000 y se analizaron en ELISA. Resultados medios:

Dilución	% de dilución a 1:100
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Téngase en cuenta que se ha observado una variación de la muestra en cuanto a la linealidad.

Linealidad, plasma con EDTA
Las muestras de plasma (n=5) se diluyeron a 1:20-1:80 y se analizaron en ELISA. Resultados medios:

Dilución	% de dilución a 1:20
1:20	100
1:40	107
1:80	116

Téngase en cuenta que se ha observado una variación de la muestra en cuanto a la linealidad.

13. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- De conformidad con el artículo 1, párrafo 2b de la Directiva europea 98/79/CE, el fabricante de los dispositivos médicos para diagnóstico in vitro persigue con su uso garantizar la idoneidad, resultados y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento de análisis, la información, las precauciones y las advertencias que figuran en las instrucciones de uso deben seguirse escrupulosamente. El uso de los kits con analizadores y aparatos similares aún debe validarse. No se autoriza ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento de análisis, como tampoco el uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de estos cambios. El fabricante no se hace responsable de resultados erróneos e incidentes debidos a estos motivos. El fabricante no se hace responsable de los resultados obtenidos por análisis visual de las muestras de pacientes.
- Solo para uso diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano empleados para la elaboración de estos reactivos se han analizado en busca de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-VHC y antígeno de la hepatitis B (HBsAg); se ha determinado que no son reactivos. No obstante, todos los materiales deben considerarse potencialmente contaminados y tratarse como si lo fueran.
- No intercambiar reactivos o tiras de distintos lotes de producción.
- No usar reactivos de otros fabricantes con reactivos de este kit de análisis.

- No usar los reactivos tras la fecha de caducidad indicada en la etiqueta o después de un mes de haber convertido reactivos concentrados en soluciones de trabajo.
- Usar solo puntas de pipeta, dispensadores y material de laboratorio limpios.
- Para impedir la contaminación cruzada, no intercambiar los tapones de rosca de los viales de reactivos.
- Cerrar los viales de reactivos con firmeza justo después de su uso, para evitar la evaporación y la contaminación microbiana.
- Tras haberlos abierto y almacenado, comprobar si hay contaminación microbiana en los viales de conjugado, calibradores y control antes de seguir usándolos.
- Para evitar la contaminación cruzada y resultados falsamente elevados, pipetear loscalibradores, controles y muestras de extracto fecal y dispensar el conjugado y sustrato de forma precisa en el fondo de los pocillos, sin salpicar.
- Algunos reactivos contienen menos de 0,1 % (m/v) de acida de sodio y/o 0,1 % de Kathon.
- Almacenar la solución de sustrato en el frasco opaco original; la solución debe ser de color transparente a amarillo claro. Mezclar suavemente antes de usar.
- **BIOHIT Calprotectin ELISA** está diseñado para su uso por parte de personal cualificado que cuente con formación en buenas prácticas de laboratorio.

13.1 Consideraciones respecto a la eliminación

Los residuos de productos químicos y preparaciones suelen considerarse peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada mediante leyes y normativas nacionales y regionales. Se recomienda ponerse en contacto con las autoridades o las empresas de tratamiento de residuos locales, que facilitarán información sobre cómo desechar los residuos peligrosos.

14. GARANTIA

Biohit deberá solucionar todo defecto hallado en cualquier Producto (el ”Producto Defectuoso”) causado por materiales inadecuados o negligencia en la manufacturación y que eviten el funcionamiento mecánico o el uso previsto de los Productos incluyendo, entre otros aspectos, las funciones indicadas en las especificaciones de Biohit para los Productos. SIN EMBARGO, EN CASO DE HALLARSE UNA FALTA CAUSA-

DA POR TRATO INDEBIDO, USO INDEBIDO, DAÑO ACCIDENTAL, CONSERVACIÓN INCORRECTA O USO DE LOS PRODUCTOS PARA PROCEDIMIENTOS FUERA DE LAS LIMITACIONES INDICADAS O DE SUS ESPECIFICACIONES, CONTRARIOS A LAS INSTRUCCIONES PROPORCIONADAS EN EL MANUAL DE INSTRUCCIONES, CUALQUIER GARANTÍA SE CONSIDERARÁ NULA. El periodo de esta garantía se indica en el manual de instrucciones de los Productos y entrará en vigor a partir de la fecha de expedición del Producto en cuestión por parte de Biohit. Este kit de Diagnóstico de Biohit se ha elaborado en conformidad con los protocolos de gestión de calidad ISO 9001 / ISO 13485. En caso de conflicto con respecto a su interpretación, se aplicará el texto en inglés.

15. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Kit BIOHIT Calprotectin ELISA para análisis de calprotectina en heces

Consultar las secciones 7-9 del prospecto del envase para obtener una descripción completa de los pasos prácticos e información sobre el análisis de plasma/suero.

Extracción

- Realizar la extracción de acuerdo con uno de los métodos que se describen en las secciones 7.1.1-7.1.2

ELISA (procedimiento manual)

- Diluir los extractos fecales a 1:100 en amortiguador para dilución de muestras
- Añadir 100 µL de calibradores, controles, blanco y muestras a la placa de ELISA
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 40±5 minutos*
- Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de amortiguador para lavado
- Añadir 100 µL de solución de conjugado a cada pocillo
- Incubar en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 40±5 minutos*
- Lavar los pocillos tres veces con 300 µL de amortiguador para lavado
- Añadir 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo
- Incubar con la placa tapada durante 20-30 minutos
- Optativo: añadir 100 µL de 1M NaOH a cada pocillo
- Leer los valores de DO a 405 nm usando un lector de ELISA
- Usando un ajuste de curva de 4 parámetros, calcular los resultados (ng/ml)
- mg/kg en heces = ng/ml × 5

* Puede reducirse a 30±5 minutos si el análisis se lleva a cabo de forma manual.

Para plantear preguntas, ponerse en contacto con info@biohit.fi

PORTUGUÊS

INSTRUÇÕES DE USO

BIOHIT Calprotectin ELISA kit Cat. Nº. 602 260

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA 101
2. CONTEXTO 101
3. PRINCÍPIO DO TESTE 102
4. MATERIAIS 103
4.1. Reagentes fornecidos com o kit 103
4.2. Materiais fornecidos com o kit 104
4.3. Materiais necessários mas não fornecidos 104
5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO 105
6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES 105
6.1. Faixas da placa de titulação revestidas 105
6.2. Tampão de diluição da amostra 106
6.3. Tampão de lavagem 106
6.4. Tampão de extração de fezes 106
6.5. Calibradores, solução em branco e controlos 106
6.6. Solução do conjugado 106
6.7. Solução do substrato 107
7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS 107
7.1. Amostras de fezes 107
7.1.1. Extração com os tubos de extração BIOHIT 108
7.1.2. Extração através do método de pesagem 108
7.2. Amostras de plasma e soro 109
8. DISPOSIÇÃO SUGERIDA DA PLACA 109
9. PROCEDIMENTO DE TESTE 110
9.1 Notas do procedimento 110
9.2 Procedimento ELISA 111
10. RESULTADOS 112
10.1 Valores de controlo de qualidade 112
10.2 Cálculo dos resultados 112
10.3 Interpretação dos resultados 113
11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO 114
12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO 114
13. AVISOS E PRECAUÇÕES 116
13.1 Considerações relativas à eliminação 117
14. GARANTIA 118
15. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO 119

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O teste **BIOHIT Calprotectin ELISA** é um método quantitativo destinado à deteção de Calprotectina em amostras de fezes. Pode ser utilizado como um instrumento de auxílio na identificação de doença orgânica do intestino delgado, do intestino grosso ou do estômago nos doentes, para determinar a atividade da doença e para monitorizar a resposta ao tratamento nos doentes com colite ulcerosa ou doença de Crohn. O **BIOHIT Calprotectin ELISA** foi validado para amostras de fezes. **O teste destina-se à utilização no diagnóstico *in vitro*.**

2. CONTEXTO

A Calprotectina é uma proteína transportadora de cálcio e zinco de 36 quilodaltons[1)] libertada sobretudo pelos leucócitos, em particular pelos granulócitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), para o lúmen intestinal durante a inflamação da mucosa intestinal. Os microrganismos do intestino estimulam a migração dos leucócitos para o lúmen intestinal. Uma vez aí, eles libertam os seus conteúdos, incluindo substâncias antimicrobianas como a Calprotectina. Esta proteína constitui cerca de 60 % das proteínas totais no citoplasma dos PMN [2)] e pode ser estimada de forma fiável em amostras de fezes armazenadas por um período máximo de sete dias à temperatura ambiente [3)].

Vários tipos de doença, como as infeções bacterianas, a artrite reumatoide e o cancro, levam à ativação dos PMN e ao aumento dos níveis de Calprotectina no plasma, no líquido cefalorraquidiano, no líquido sinovial, no líquido sulcular, na urina ou em outros materiais humanos [4)].

A concentração de Calprotectina nas fezes está correlacionada com o número de PMN que migram para o lúmen intestinal [5)] e pode ser detetada de forma fiável mesmo em pequenas amostras aleatórias de fezes (com menos de uma grama) [3,6)]. As doenças orgânicas do intestino emitem um sinal forte de Calprotectina, isto é, apresentam frequentemente elevações entre cinco e vários milhares de vezes superiores ao nível de referência mais alto nos indivíduos saudáveis [3,7-9)], o que indica uma inflamação intestinal. As doenças inflamatórias do intestino (DII), como a colite ulcerosa e a doença de Crohn, podem surgir entre a primeira infância e a idade adulta tardia e o diagnóstico é muitas vezes tardio devido a sintomas vagos ou à relutância dos doentes em realizar uma endoscopia e uma biopsia. O **BIOHIT Calprotectin ELISA** pode contribuir para um diagnóstico mais precoce das DII, uma vez que o teste

apresenta geralmente um resultado positivo para as DII ativas.

Os distúrbios funcionais, como a síndrome do intestino irritável (SII), não provocam um aumento das concentrações de Calprotectina fecal, ao contrário dos distúrbios abdominais orgânicos, como as DII. Os doentes com distúrbios abdominais funcionais e orgânicos podem apresentar sintomas semelhantes e um simples exame clínico pode não ser suficiente para encontrar um diagnóstico específico. Um teste de Calprotectina fecal é um método objetivo, económico, não invasivo e simples que pode ajudar a determinar quais os doentes que devem ser submetidos a exames adicionais, como uma endoscopia. Os sintomas abdominais são muito comuns nas crianças e nos adultos e um resultado negativo obtido pelo **BIOHIT Calprotectin ELISA** pode excluir doenças inflamatórias do intestino com um elevado grau de probabilidade [7)].

A recuperação da mucosa é o grande objetivo do tratamento das DII e um teste de Calprotectina fecal permite saber quando tal é conseguido. Muitos doentes que sofrem de DII em remissão clínica com níveis normais da proteína C reativa (PCR) apresentam ainda uma inflamação persistente [10)], o que se reflete num aumento da Calprotectina fecal. Estes doentes apresentam um maior risco de recaída no espaço de alguns meses [11)]. Se for possível conseguir a recuperação da mucosa, o risco de recaída será reduzido, bem como a necessidade de uma grande cirurgia abdominal [12,13)]. A normalização dos níveis de Calprotectina significa que foi conseguida a recuperação da mucosa [14)]. A nossa tecnologia Calprotectin ELISA foi também utilizada na análise de amostras de soro e plasma e foram detetados níveis elevados de Calprotectina nos doentes com infeções bacterianas [15,16)], sepsia e doenças inflamatórias, como artrite reumatoide (AR) e Lúpus Eritematoso Disseminado (LED) [17-21)]. Estudos científicos mostram que a presença de Calprotectina no soro/plasma é um excelente indicador de atividade da doença na AR e no LED e pode prever crises. É igualmente um bom indicador de eventos coronários agudos que antecedem o enfarte do miocárdio [22-24)].

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste **BIOHIT Calprotectin ELISA** baseia-se na preparação de um extrato de fezes com o Tampão de extração de fezes. O nível de Calprotectina é determinado por meio da submissão do extrato a um teste num ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específico para a Calprotectina.

No ELISA, as amostras e as soluções padrão são incubadas em poços de titulação separados revestidos com anticorpos monoclonais que ligam a Calprotectina. Após a incubação e a lavagem dos poços, permite-se que a Calprotectina ligada reaja com anticorpos específicos da Calprotectina purificados por imunoafinidade e marcados com enzima. Após esta reação, a quantidade de enzimas ligadas aos poços de titulação é proporcional à quantidade de Calprotectina na amostra ou na solução padrão, que é determinada por incubação com um substrato para a enzima que produz um produto colorido. A intensidade da cor é determinada por absorvância através da utilização de um leitor de placas ELISA e é proporcional à concentração de Calprotectina nas soluções calibradores nas amostras. O ensaio é calibrado utilizando Calprotectina purificada de extrato de leucócitos.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos com o kit

Placa de titulação revestida: 12 faixas, 8 poços por faixa, revestidas com anticorpos monoclonais de rato purificados por afinidade e específicos para a Calprotectina. A placa está armazenada numa embalagem selada com dessecante.

DILBUF 5x **Tampão de diluição da amostra (conc. 5x) *****: 1 x 20 mL, concentrado 5x, para ser diluído com água destilada/desionizada; pH 8 ± 0,2, solução amarela, frasco com tampa azul.

WASH 20x **Tampão de lavagem (conc. 20x) ***: 1 x 50 mL, concentrado 20x, para ser diluído com água destilada/desionizada, destinado à lavagem dos poços de titulação; pH 7,8 ± 0,2, solução límpida, frasco com tampa branca.

FEC EXTRBUF 2.5X **Tampão de extração de fezes (conc. 2,5x) ****:
2 x 90 mL, concentrado 2,5x, para ser diluído com água destilada/desionizada; pH 8 ± 0,2, solução límpida, frascos com tampas brancas.

CAL 1-5 **calibradores de Calprotectina e** **BLANK** *******: 6 frascos de 1 mL, prontos a utilizar; solução amarela, frascos com tampas de cores diferentes:

Solução em branco: tampa azul	0	ng/mL
Calibrador 1: tampa verde	7.8	ng/mL

Calibrador 2: tampa amarela	31.3	ng/mL
Calibrador 3: tampa vermelha	62.5	ng/mL
Calibrador 4: tampa branca	125	ng/mL
Calibrador 5: tampa preta	500	ng/mL

CONTROL LOW **CONTROL HIGH** **Controlos "Baixo" e "Alto" *****:
2 frascos de 1 mL, prontos a utilizar; solução amarela; Controlo baixo: frasco com tampa castanha; Controlo alto: frasco com tampa roxa.

CONJ **Solução do conjugado ******: 13 mL de anticorpos policlonais de coelho purificados por imunoafinidade e marcados com fosfatase alcalina contra a Calprotectina, pronto a utilizar; solução vermelha, tubo de reagente Dynex de 25 mL com tampa branca.

SUBS **Solução do substrato (pNPP)**: 113 mL, pronto a utilizar; solução de cor límpida a ligeiramente amarela, frasco opaco com tampa amarela. O frasco contém péletes estabilizadores.

Nota: em caso de utilização de um instrumento Dynex, é necessário transferir o substrato para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste.

* Contém Kathon a 0,1 %
** Contém azida de sódio a <0,1 %
*** Contém Kathon a 0,1 % e azida de sódio a<0,1 %
**** Contém metilisotiazolona a 0,02 % e bromonitrodioxano a 0,02 %

4.2. Materiais fornecidos com o kit
- 2 películas vedantes
- 1 protocolo de teste
- 1 disposição da placa

4.3. Materiais necessários mas não fornecidos
- Água destilada/desionizada
- Dispositivos de extração (consultar secção 7.1.1 e 7.1.2)
- Ansas de inoculação descartáveis e quebráveis (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)
- Balança digital de precisão (40 – 150 mg) (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)
- Tubos de poliestireno descartáveis com tampa de rosca, 5 mL (em caso de utilização do método de pesagem descrito na secção 7.1.2)

- Agitador vortex
- Tubos descartáveis para diluição das amostras: tubos Eppendorf ou semelhantes (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Pipetas para distribuir volumes entre 10 e 1000 µL (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Pipeta repetitiva ou pipeta multicanal, 100 µL (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Lavador de poços de microplacas ou pipeta multicanal, 300 µL (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Agitador de placas (500 – 700 rpm) (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Temporizador (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- Leitor de microplacas, filtro de 405 nm (caso o ensaio seja realizado manualmente)
- 1M NaOH (solução de paragem; opcional)

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Se forem armazenados numa embalagem fechada à temperatura de 2—8°C, os reagentes do kit permanecem estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo.

As placas, reagentes e tampões concentrados abertos permanecem estáveis por um máximo de três meses quando armazenados à temperatura de 2—8 °C.

Se forem preparadas em recipientes limpos, as soluções de trabalho (1x) do Tampão de lavagem, do Tampão de diluição da amostra e do Tampão de extração de fezes podem ser armazenadas à temperatura de 2—8 °C pelo período máximo de um mês.

Evitar a exposição a temperaturas elevadas e à luz solar direta.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes, amostras e controlos devem estar à temperatura ambiente (18—25 °C) antes da realização do teste.

6.1. Faixas da placa de titulação revestidas

As faixas da placa prontas a utilizar estão revestidas com anticorpos monoclonais de rato purificados por afinidade e específicos para a Calprotectina. As faixas não utilizadas devem ser removidas da estrutura e

fechadas imediatamente na bolsa de alumínio, juntamente com o dessecante fornecido. Armazenar a 2—8 °C.

6.2. Tampão de diluição da amostra
Diluir o Tampão de diluição da amostra concentrado 5x através da adição de 1 parte (20 mL) a 4 partes (80 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 100 mL. Misturar bem. Armazenar o Tampão de diluição da amostra diluído num recipiente fechado a 2—8 °C.
Nota: em caso de utilização de um sistema automático de ELISA Dynex DS2 ou DSX, é necessário transferir o Tampão de diluição da amostra para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste.

6.3. Tampão de lavagem
Diluir o Tampão de lavagem concentrado 20x através da adição de 1 parte (50 mL) a 19 partes (950 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 1000 mL. Misturar bem. Armazenar o Tampão de lavagem diluído num recipiente fechado a 2—8 °C.

6.4. Tampão de extração de fezes
Diluir o Tampão de extração de fezes concentrado 2,5x através da adição de 1 parte (90 mL) a 1,5 partes (135 mL) de água destilada/desionizada num recipiente limpo até atingir um volume final de 225 mL. Misturar bem. Armazenar o tampão diluído num recipiente fechado a 2—8 °C.

6.5. Calibradores, solução em branco e controlos
Os frascos rotulados com solução em branco, calibrador e controlos contêm 1 mL cada de uma solução pronta a utilizar. A concentração de Calprotectina está impressa no rótulo de cada frasco. Os frascos encaixam diretamente nos sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX.

6.6. Solução do conjugado
O tubo contém 13 mL de anticorpos de coelho purificados por imunoafinidade e marcados com fosfatase alcalina (ALP) contra a Calprotectina num tampão com estabilizadores, conservantes e um corante vermelho inerte. A solução está pronta a utilizar. O tubo encaixa diretamente nos sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX.

6.7. Solução do substrato
O frasco contém 13 mL de solução de p-nitrofenilfosfato (pNPP). A solução está pronta a utilizar e deve ser armazenada no frasco opaco original.

Nota: em caso de utilização de um sistema automático de ELISA Dynex DS2 ou DSX, é necessário transferir a Solução do substrato enzimático para um tubo de reagente Dynex de 25 mL antes de realizar o teste. Evitar a transferência dos péletes estabilizadores.

7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS
O teste BIOHIT Calprotectin ELISA foi concebido e validado principalmente para amostras de fezes, mas também pode ser utilizado para amostras de plasma/soro.

7.1. Amostras de fezes
Uma vez que a Calprotectina é muito estável em fezes, os doentes podem recolher pequenas amostras de fezes em casa. Recolher 1—5 g (aproximadamente uma colher de chá), colocar num recipiente limpo adequado e entregar no laboratório o mais rapidamente possível, no prazo máximo de quatro dias. Quando colocada num recipiente aprovado para transporte, a amostra pode ser enviada por correio normal, sem ser necessária refrigeração. Deve ser evitada a exposição a temperaturas superiores a 30 °C.

As amostras também podem ser armazenadas congeladas, a uma temperatura igual ou inferior a -20 °C, até serem entregues ou enviadas por correio. As amostras congeladas devem ser descongeladas e estabilizadas à temperatura ambiente antes da extração e do teste. Tenha em atenção que a congelação de amostras de fezes pode provocar em alguns casos um aumento dos níveis de Calprotectina, muito provavelmente devido à libertação dos granulócitos.

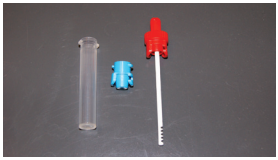
Nota: antes da extração da pequena quantidade necessária, a amostra de fezes deve ser bem homogeneizada com uma espátula, por exemplo.

Para a extração, recomendamos a utilização dos tubos de extração BIOHIT ou do outro método descrito abaixo (capítulo 7.1.1 e 7.1.2). Realizar a extração de acordo com o folheto informativo do dispositivo/método de extração escolhido. Podem ser utilizados outros métodos e dispositivos

validados pelo cliente.

7.1.1. Extração com os tubos de extração BIOHIT

Instruções de utilização: leia o folheto informativo do produto com a Ref. 602 270.



7.1.2. Extração através do método de pesagem (sem dispositivo de extração)

1. Pesar (avaliar a tara de) um tubo com tampa de rosca vazio com uma ansa de inoculação.
2. Retirar aproximadamente 100 mg (entre 40 e 120 mg) de fezes com a ansa de inoculação e colocá-las no tubo com tampa de rosca. Evitar a extração de material sólido e não digerido, como fibras e sementes.
3. Pesar o tubo e a ansa com as fezes para obter o peso líquido das fezes.
4. Quebrar ou cortar a metade superior da haste da ansa e deixar a metade inferior no interior do tubo.
5. Adicionar o tampão de extração até obter uma relação peso/ volume de 1:50, por exemplo, 4,9 mL de tampão para 100 mg de fezes. Fechar o tubo.
6. Misturar energicamente durante 30 segundos num agitador vortex.
7. Continuar a mistura num agitador (a aprox. 1000 rpm) durante 30±5 minutos, com a ansa no interior do tubo a servir de agitador.
8. Deixar repousar alguns minutos na bancada para que as partículas assentem e pipetar cuidadosamente a partir da parte superior do tubo. Não é necessária centrifugação. No entanto, se for necessária uma solução sem partículas, pode ser realizado um pequeno ciclo de centrifugação.
9. O extrato, que representa uma diluição de 1:50 (peso/volume) da amostra de fezes, está pronto para a diluição e o teste.
10. Para armazenar, transferir cerca de 0,5 mL para um novo tubo. Os extratos podem ser armazenados a 2—8 °C durante, pelo menos,

cinco dias ou congelados a menos de -20 °C pelo período máximo de 2 anos.

7.2. Amostras de plasma e soro

Para obter os níveis reais de Calprotectina no soro ou no plasma, a proteína não pode ser libertada dos granulócitos neutrófilos no sangue in vitro. Para o plasma, o EDTA é o anticoagulante preferido.

Procedimento recomendado de preparação das amostras:

1. Colher sangue com Vacutainers.
2. Centrifugar o sangue a 3000 rpm durante 10 minutos o mais rapidamente possível e no prazo máximo de três horas após a amostragem.
3. Recolher apenas os dois terços superiores da camada de soro ou plasma por meio de pipetagem cuidadosa a fim de evitar a aspiração dos leucócitos da camada leucocitária.

Para testes ELISA, diluir o plasma ou o soro numa proporção de 1:20 (por exemplo, 50 µL de amostra + 950 µL do Tampão de diluição da amostra) e seguir o procedimento de ensaio descrito na Secção 9.

8. DISPOSIÇÃO SUGERIDA DA PLACA

	1	2	3	4	etc.	
A	Calibrador 5 500 ng/mL	Calibrador 5 500 ng/mL	Amostra 1	Amostra 1		
B	Calibrador 4 125 ng/mL	Calibrador 4 125 ng/mL	Amostra 2	Amostra 2		
C	Calibrador 3 62,5 ng/mL	Calibrador 3 62,5 ng/mL	Amostra 3	Amostra 3		
D	Calibrador 2 31,3 ng/mL	Calibrador 2 31,3 ng/mL	Amostra 4	Amostra 4		
E	Calibrador 1 7,8 ng/mL	Calibrador 1 7,8 ng/mL	Amostra 5	Amostra 5		
F	Solução em branco 0 ng/mL	Solução em branco 0 ng/mL	Amostra 6	Amostra 6		
G	Controlo “Baixo”	Controlo “Baixo”	Amostra 7	Sample 7		
H	Controlo “Alto”	Controlo “Alto”	Amostra 8	Amostra 8		

Disposição sugerida da placa ELISA para calibradores, controlos e amostras com procedimento manual. Recomenda-se a utilização de poços duplicados para maior fiabilidade dos resultados. Uma placa completa tem capacidade para 40 amostras.

9. PROCEDIMENTO DE TESTE

O seguinte procedimento destina-se aos testes manuais. Os protocolos validados para os sistemas automáticos de ELISA Dynex DS2 e DSX estão disponíveis mediante pedido. Tenha em atenção que os frascos dos calibradores, da solução em branco e do controlo positivo, bem como do tubo do conjugado, encaixam diretamente nos sistemas automáticos de ELISA DS2 ou DSX. Podem ser utilizados outros instrumentos ELISA automáticos, mas estes terão de ser validados pelo cliente.

9.1 Notas do procedimento

- Preparação: Leia cuidadosamente o protocolo de teste antes de realizar o ensaio. A fiabilidade do resultado depende da observância rigorosa do protocolo de teste descrito. Antes de começar o ensaio, deve ser cuidadosamente estabelecida uma disposição da placa para todas as soluções em branco, calibradores, controlos e amostras, utilizando, por exemplo, a folha fornecida no kit. Selecione o número necessário de faixas de titulação. As faixas não utilizadas devem ser fechadas novamente na bolsa de alumínio e armazenadas segundo o procedimento descrito na Secção 6.1.
- Recomenda-se uma diluição de 1:100 dos extratos de fezes. Esta diluição proporcionará resultados da amostra entre 25 mg/kg (LoQ) e 2500 mg/kg nas fezes. Os extratos com valores mais elevados de Calprotectina podem ser mais diluídos (>1:100) e testados novamente, caso seja necessário um valor. Os extratos com valores baixos de Calprotectina podem ser menos diluídos (1:50). O fator de diluição ajustado deve ser tido em conta ao fazer a conversão entre ng/mL e mg/kg (consultar a secção 10 abaixo).
- Execute todos os passos do ensaio segundo a ordem indicada e sem qualquer atraso considerável entre eles.
- Deve ser utilizada uma ponta de pipeta descartável e limpa na distribuição de cada solução padrão, controlo e amostra.
- Para obter os resultados mais fiáveis, as soluções em branco, os controlos e as amostras do doente devem ser sempre processados em duplicado.
- Todas as amostras e reagentes do kit devem ser estabilizados à tem-

peratura ambiente (18—25 °C) antes do início do teste.

9.2 Procedimento ELISA

1. Diluir as amostras dos extratos de fezes numa proporção de 1:100 (por exemplo, 10 µL de amostra + 990 µL do Tampão de diluição da amostra) e misturar bem por vortex.
2. Adicionar 100 µL de cada solução em branco, calibrador, controlo e amostra diluída a poços duplicados; consultar a disposição recomendada da placa na Secção 8.
3. Cobrir a placa com uma película vedante e incubar à temperatura ambiente durante 40±5 minutos*) num agitador de placas horizontal (aproximadamente 500—700 rpm).
4. Após o período de incubação, remover o líquido e lavar os poços através da adição de 300 µL de Tampão de lavagem a cada poço. Remover o máximo de líquido possível e repetir até alcançar um total de três lavagens. Em caso de utilização de um lavador de placas, verificar se todas as sondas de aspiração e enchimento estão desobstruídas para garantir a lavagem eficaz de todos os poços. Após a última lavagem, inverter a placa e passar papel absorvente pelas aberturas dos poços para remover quaisquer vestígios de Tampão de lavagem.
5. Misturar cuidadosamente o conteúdo do frasco do Conjugado antes da utilização (não agitar). Adicionar 100 µL de conjugado a cada poço, de preferência com uma pipeta repetitiva ou multicanal.
6. Cobrir a placa com película vedante e incubar à temperatura ambiente durante 40±5 minutos*) num agitador de placas horizontal (aproximadamente 500—700 rpm).
7. Repetir três vezes os passos de lavagem descritos acima com 300 µL de Solução de lavagem por poço.
8. Adicionar 100 µL de Solução do substrato a cada poço, de preferência com uma pipeta repetitiva ou multicanal.
9. Incubar a placa à temperatura ambiente (sem agitar) durante 20—30 minutos, protegido da luz.
10. Opcional: adicionar 100 µL de solução de paragem 1M NaOH a cada poço, caso seja necessário um período de incubação fixo.
11. Ler os valores da densidade ótica (DO) a 405 nm com um leitor ELISA. Agitar brevemente a placa (2—3 segundos) antes da leitura, caso o leitor de placas tenha esta opção.

*) **Opcional**: Período de incubação reduzido (procedimento manual). O período de incubação pode ser reduzido para 30±5 minutos sem alteração dos resultados. Pode ser observada uma redução dos valores da DO e o valor máximo da DO para a solução

padrão superior (500 ng/mL) pode ficar abaixo do valor recomendado de 1800, mas tal não afeta os resultados.

10. RESULTADOS

10.1 Valores de controlo de qualidade

- Deve ser incluída uma nova curva padrão em cada execução.
- Os controlos positivos devem ser incluídos em cada execução. O valor dos controlos deve estar dentro dos limites impressos nos rótulos dos frascos.
- Como ponto de referência, o valor de DO do Calibrador 5 (500 ng/mL) deve ser ≥ 1,6 e o valor de DO da Solução em branco (0 ng/mL) deve ser ≤ 0,25. Na figura 1, é apresentada uma curva representativa do Calibrador.

10.2 Cálculo dos resultados

Cálculo da concentração de Calprotectina em amostras de fezes dos doentes:

1. Calcular os valores médios de DO de todos os poços duplicados (solução em branco, calibradores e amostras).
2. Representar graficamente o valor da solução em branco e de cada calibrador e concentração (ng/mL) no eixo x contra o seu valor médio de DO no eixo y para obter uma curva padrão. **Recomenda-se a utilização de uma função de ajuste da curva de 4 parâmetros** (ver figura 1 abaixo). Se for necessário um eixo x logarítmico, deve ser usado um valor de 0,001 ng/mL para a solução padrão A (0 ng/mL).
3. Utilizar a curva de calibração para determinar a concentração de Calprotectina nas amostras diluídas (ng/mL) com base nos seus valores de DO.
4. **Multiplicar a concentração de Calprotectina (ng/mL) nos extratos de fezes diluídos por 5 para fazer a conversão em mg/kg de Calprotectina na amostra de fezes original.**

Este fator corrige a diluição total de 1:5000 (1:50 durante o procedimento de extração e a diluição seguinte de 1:100 dos extratos) e converte o valor de ng/mL em mg/kg.

Exemplo: se uma amostra de extrato diluída apresentar um valor de 100 ng/mL, a concentração na amostra de fezes original era de 100 x 5 =

500 mg/kg.

Nota: se os extratos tiverem sido diluídos numa proporção superior (ou inferior) à proporção de 1:100, o fator de diluição adicional deve ser tido em consideração no cálculo.

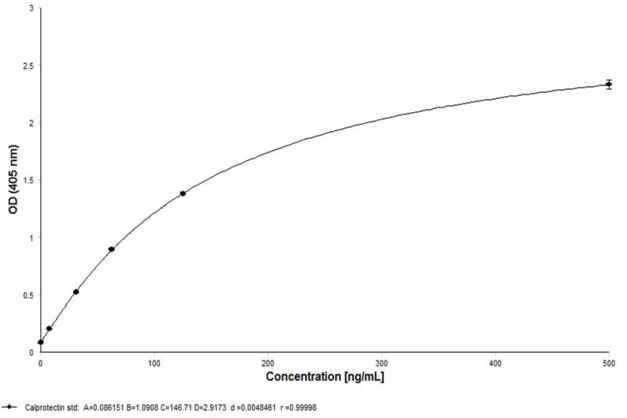


Figura 1: Uma curva padrão representativa com um ajuste de curva de 4 parâmetros.

10.3 Interpretação dos resultados

A literatura publicada expôs os seguintes valores de Calprotectina em amostras de fezes [3, 25]:

Valor normal	5 – 50 mg/kg
Positive value	> 50 mg/kg
Valor médio em doentes com cancros colorretais sintomáticos	350 mg/kg
Doença inflamatória do intestino sintomática ativa	200 – 40 000 mg/kg

Tenha em atenção que um diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado de um único teste. O diagnóstico deve ter em consideração o historial clínico e os sintomas.

Os seguintes valores de Calprotectina foram encontrados no sangue de 100 dadores de sangue saudáveis (50 homens e 50 mulheres):

Tipo de amostra:	Média (µg/L):	DP:
Plasma EDTA	627	307

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O diagnóstico não deve ser baseado apenas no resultado de um único teste.

12. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Nota: Todos os estudos de verificação do projeto foram realizados por meio de testes manuais em amostras de extratos de fezes (diluídas a 1:100) ou amostras de plasma EDTA (diluídas a 1:20), utilizando o procedimento ELISA descrito na Secção 9.

Precisão interensaio e intraensaio dos extratos de fezes e precisão intraensaio do plasma EDTA:

Precisão interensaio, extratos de fezes*		Precisão intraensaio, extratos de fezes**		Precisão intraensaio, plasma EDTA***	
Concentração nas fezes (mg/kg)	% CV	Concentração nas fezes (mg/kg)	% CV	Concentração no plasma (µg/L)	% CV
32.1	13	28.7	6.7	166	3.8
171	6.0	173	3.6	740	4.7
368	4.8	385	4.1	1160	2.9
583	6.1	592	4.0	1360	3.5
1215	6.8	1210	4.2	2980	3.2
1977	7.9	1966	5.0	3660	10

*Resultados médios de três laboratórios distintos, com cada um a testar dois lotes de kit diferentes: foram testadas seis amostras num total de 10 vezes durante cinco dias

** Resultados médios de três laboratórios distintos, com cada um a testar dois lotes de kit diferentes: foram testadas seis amostras com 10 réplicas numa execução

*** Testado com um lote de kit; foram diluídas seis amostras a 1:20 e testadas com 10 réplicas numa execução

Recuperação:
Fezes: 85—105 %; testadas com extrato de fezes fortificado com Calprotectina purificada em cinco níveis diferentes.
Plasma: 81—105 %; testado com plasma fortificado com Calprotectina purificada em cinco níveis diferentes.

Limite de quantificação:
5 ng/mL; testado com extrato de fezes, plasma e Calprotectina purificada. As amostras foram analisadas cinco vezes durante cinco dias. Neste nível, o CV médio das diferentes amostras e determinações era de 12 %.

Limite de deteção:
< 5 ng/mL; calculado como média (Tampão de diluição da amostra; n= 32) + 5x DP.

Interferência
Não foi observada qualquer interferência sobre o ELISA por parte de medicamentos utilizados vulgarmente. Prednisolona, Imurel, Salazopirina e Ciprofloxacina.

Precisão de extração
Foram extraídas duas amostras de fezes 10 vezes cada, segundo o procedimento descrito na secção 7.1.2, e os extratos foram analisados no ELISA. Resultados médios de três laboratórios distintos e um lote de kit:

Amostra	Concentração (mg/kg)	% CV
Low	130	8.7
High	1357	8.8

Linearidade, extratos de fezes

Os extratos de fezes (n=10) foram diluídos a 1:100 e 1:1000 e analisados no ELISA. Resultados médios:

Diluição	% da diluição de 1:100
1:100	100
1:400	103
1:700	105
1:1000	107

Tenha em atenção que foi observada uma variação amostral na linearidade.

Linearidade, plasma EDTA

As amostras de plasma (n=5) foram diluídas a 1:20 e a 1:80 e analisadas no ELISA. Resultados médios:

Diluição	% da diluição de 1:20
1:20	100
1:40	107
1:80	116

Tenha em atenção que foi observada uma variação amostral na linearidade.

13. AVISOS E PRECAUÇÕES

- Em conformidade com o parágrafo 2b do artigo 1.º da diretiva europeia 98/79/CE, a utilização dos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro é prevista pelo fabricante para assegurar a adequação, o desempenho e a segurança do produto. Por conseguinte, o procedimento de teste, as informações, as precauções e os avisos presentes nas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidos. A utilização de kits de teste com analisadores e equipamento semelhante não foi validada. Não é permitida qualquer alteração a nível de conceção, composição e procedimento de teste, nem a utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante. O utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é responsável por

resultados falsos e incidentes decorrentes dessas alterações. O fabricante não é responsável por quaisquer resultados obtidos por meio da análise visual das amostras do doente.
- Apenas para utilização no diagnóstico in vitro.
- Todos os componentes de origem humana utilizados na produção destes reagentes foram submetidos a um teste para deteção de anticorpos anti-VIH, anticorpos anti-VHC e antigénio da hepatite B (Bag) e revelaram-se não reativos. Não obstante, todos os materiais devem ser considerados e manuseados como potencialmente infeciosos.
- Não utilizar reagentes ou faixas de lotes de produção diferentes.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes com reagentes deste kit de teste.
- Não utilizar os reagentes depois do prazo de validade indicado no rótulo ou 1 mês depois da preparação de reagentes concentrados em soluções de trabalho.
- Utilizar apenas pontas de pipeta, distribuidores e acessórios de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas de rosca dos frascos de reagentes para evitar a contaminação cruzada.
- Fechar bem os frascos de reagentes imediatamente após a utilização para evitar a evaporação e a contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e o armazenamento posterior, verificar os frascos dos conjugados, das soluções calibradores e dos controlos quanto à existência de uma possível contaminação microbiana antes da reutilização.
- Para evitar a contaminação cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as soluções calibradores, os controlos e as amostras dos extratos de fezes e dispensar o conjugado e o substrato com precisão no fundo dos poços de microplacas sem salpicos.
- Alguns reagentes contêm azida de sódio numa concentração inferior a 0,1 % (p/v) e/ou Kathon a 0,1 %.
- Armazenar a solução do substrato no frasco opaco original; a solução deve apresentar uma cor límpida a ligeiramente amarela. Misturar cuidadosamente antes da utilização.
- O **BIOHIT Calprotectin ELISA** foi concebido para ser utilizado por pessoal qualificado com formação em boas práticas de laboratório.

13.1 Considerações relativas à eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados resíduos perigosos. A eliminação deste género de resíduos é

regulamentada por leis e regulamentos nacionais e regionais. Contactar as autoridades ou empresas de gestão de resíduos locais para obter orientações em matéria de eliminação de resíduos perigosos.

14. GARANTIA

O Biohit deve solucionar todos os defeitos detectados em qualquer Produto (o "Produto com defeito") que resultarem de materiais inadequados ou de fabricação negligente e que impeçam o funcionamento mecânico ou a utilização prevista dos Produtos, incluindo, sem limitação, as funções descritas nas especificações Biohit para os Produtos. NO ENTANTO, QUALQUER GARANTIA SERÁ CONSIDERADA NULA SE A FALHA FOR CAUSADA POR TRATAMENTO INADEQUADO, UTILIZAÇÃO INADEQUADA, DANOS ACIDENTAIS, ARMAZENAMENTO INCORRETO OU USO DOS PRODUTOS PARA OPERAÇÕES FORA DE SUAS LIMITAÇÕES ESPECIFICADAS OU FORA SUAS ESPECIFICAÇÕES, CONTRÁRIAS ÀS INSTRUÇÕES DETERMINADAS NO MANUAL DE INSTRUÇÕES. O período dessa garantia é definido no manual de instruções dos Produtos e começará a partir da data em que o Produto relevante for enviado pela Biohit. Esse kit de diagnóstico Biohit foi fabricado de acordo com os protocolos de gestão de qualidade ISO 9001/ISO 13485. Em caso de litígio de interpretaçãoo texto em Inglês aplica.

15. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO

Kit BIOHIT Calprotectin ELISA para análise de Calprotectina nas fezes

Consultar as secções 7—9 no folheto informativo para obter uma descrição completa dos passos práticos e para a análise de plasma/soro.

Extração

- Realizar a extração de acordo com um dos métodos descritos na secção 7.1.1 – 7.1.2

ELISA (procedimento manual)

- Diluir os extratos de fezes na proporção de 1:100 no Tampão de diluição da amostra
- Adicionar 100 µL de calibradores, controlos, soluções em branco e amostras à placa ELISA
- Incubar num agitador de placas à temperatura ambiente durante 40±5 minutos*)
- Lavar os poços três vezes com 300 µL de Tampão de lavagem
- Adicionar 100 µL de solução de Conjugado a cada poço
- Incubar num agitador de placas à temperatura ambiente durante 40±5 minutos*)
- Lavar os poços três vezes com 300 µL de Tampão de lavagem
- Adicionar 100 µL de Solução de substrato a cada poço
- Incubar com uma cobertura durante 20—30 minutos
- Opcional: adicionar 100 µL de 1M NaOH a cada poço
- Ler os valores de DO a 405 nm com um leitor ELISA
- Calcular os resultados por meio da utilização de um ajuste de curva de 4 parâmetros (ng/mL)
- mg/kg nas fezes = ng/mL × 5

*) pode ser reduzido para 30±5 minutos se o ensaio for executado manualmente.

Para qualquer pergunta, contactar info@biohit.fi

REFERENCES / KIRJALLISUUS / HÄNVISNINGAR / RÉFÉRENCES / REFERENCIAS / REFERÊNCIAS

1. Dale I et al.: Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. Eur J Biochem 1983;134: 1-6. Fagerhol MK et al.: Calprotectin (The L1 leukocyte protein) in: Smith VL and Dedman JR (eds): Stimulus response coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Raton 1990, p. 187- 210.
2. Røseth AG et al.: Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. Scand J Gastroenterol 1992; 27: 793-798.
3. Johne B et al.: Functional and clinical aspects of the myelomonocytic protein calprotectin. J Clin Pathol: Mol Pathol 1997; 50:113-123.
4. Røseth AG et al.: Correlation between fecal excretion of Indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 1999; 34: 50-54.
5. Tøn H et al.: Improved assay for fecal calprotectin. Clinica Chimica Acta 2000; 292: 41-54.
6. Tibble J et al.: A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. Gut 2000; 47: 506-513.
7. Bunn SK et al.: Fecal calprotectin: Validation as a non-invasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2001;33: 14-22.
8. Bjarnason I and Sherwood R: Fecal calprotectin: A significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. J Paediatric Gastroenterology Nut 2001; 33: 11-13.
9. Siegmund B et al.: [What has been confirmed in the treatment of inflammatory bowel disease?]. Internist 2010;51:1492-1498.
10. Tibble JA et al.: Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] Gastroenterology 2000; 119(1):15-22.
11. Schnitzler F et al.: Mucosal healing predicts long-term outcome of maintenance therapy with infliximab in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 2009;15:1295-1301.
12. Björkesten CG et al.: Endoscopic monitoring of infliximab therapy in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2011; 17(4): 947-953.
13. Røseth AG et al.: Assessment of disease activity in ulcerative colitis by fecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. Digestion

1997; 58:176-80.
14. Devlin SM and Panaccione R: Evolving inflammatory bowel disease treatment paradigms: top-down versus step-up. Med Clin North Am. 2010;94:1-18.
15. Pineton de Chambrun G et al.: Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7(1):15-29.
16. Lichtenstein GR and Rutgeerts P: Importance of mucosal healing in ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2010;16:338-346.
17. Smith MA et al.: Pharmacogenomics in the treatment of inflammatory bowel disease. Pharmarcogenetics, 2010;11(3):421-437.
18. Lin MV et al.: What is the optimal therapy for Crohn's disease: step-up or top-down? Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2010;4(2):167-180.
19. Strauch U and Schölmerich J.: Emerging drugs to treat Crohn's disease. Expert Opin Emerg Drugs, 2010;15(2):309-322.
20. Isaacs KL: How rapidly should remission be achieved? Dig Dis 2010;28(3):548-555.
21. Schwartz M and Regueiro M: Prevention and treatment of postoperative Crohn's disease recurrence: an update for a new decade. Curr Gastroenterol Rep. 2011 Feb;13(1):95-100.
22. Ha C and Kornbluth A: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: where do we stand? Curr Gastroenterol Rep. 2010;12(6):471-478.
23. Fagerberg UL et al.: Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;45(4):414-420.
24. Johne B et al: A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Scand J Gastroenterol 2001; 36: 291-296.

ORDERING INFORMATION / TILAUS INFORMAATIO / BESTÄLLNINGSINFORMATION / INFORMATION CONCERNANT LA COMMANDE / INFORMACIÓN DE PEDIDOS / INFORMAÇÕES PARA COMPRA

BIOHIT Calprotectin ELISA kit

Cat. No. 602 260

Headquarters / Pääkonttori / Huvudkontor / Siège principal / Sede centrale / Sede
BIOHIT OYJ
Laippatie 1
00880 Helsinki, Finland
Tel: +358 9 773 861
Fax: +358 9 7738 6200
E-mail: info@biohit.fi
www.biohithealthcare.com